UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1968-1969 N° 854

# ÉTUDE DE QUELQUES ENZYMOPATHIES ÉRYTHROCYTAIRES: A PROPOS DE SEPT CAS ÉTUDIÉS EN ALSACE

## THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 24 avril 1969

devant la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

Gilbert LAZARD

Pharmacien
Diplômé d'études supérieures de Biochimie Dynamique.
Diplômé d'études spéciales de Biochimie Pharmaceutique et Technique
Lauréat de la Faculté

---

Examinateurs de la Thèse — MM. Pierre MÉTAIS, Professeur, Président
Paul CORDIER, Professeur
André STAHL, Maître de Conférences
Jean JUIF, Professeur agrégé — Juges

1969

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1968-1969 — N° 854

# ÉTUDE DE QUELQUES ENZYMOPATHIES ÉRYTHROCYTAIRES: A PROPOS DE SEPT CAS ÉTUDIÉS EN ALSACE

## THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 24 avril 1969

devant la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

**Gilbert LAZARD**

Pharmacien
Diplômé d'études supérieures de Biochimie Dynamique.
Diplômé d'études spéciales de Biochimie Pharmaceutique et Technique
Lauréat de la Faculté

---

Examinateurs de la Thèse — Juges

MM. **Pierre MÉTAIS**, Professeur, Président
**Paul CORDIER**, Professeur
**André STAHL**, Maître de Conférences
**Jean JUIF**, Professeur agrégé

1969

UNIV.
LEIDEN
NBL.

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Doyen : M. M.HASSELMANN.

Doyen honoraire : M. P.DUQUÉNOIS.

Assesseur : M. J.SCHREIBER.

Professeurs :

| | | |
|---|---|---|
| MM. | R.SARTORY | Bactériologie et Cryptogamie |
| | P.CORDIER | Pharmacie chimique |
| | P.DUQUÉNOIS | Matière médicale et Hydrologie |
| | P.JAEGER | Botanique |
| | G.GAZET DU CHATELIER | Pharmacie galénique |
| | M.HASSELMANN | Chimie analytique et Toxicologie |
| | J.SCHREIBER | Chimie organique |
| | P.MÉTAIS | Chimie biologique |
| | G.LAUSTRIAT | Physique et Mathématiques |
| | J.Cl.STOCLET | Pharmacodynamie |

Professeurs honoraires : MM. Ch.LAPP - J.P.EBEL.

Professeurs sans chaire :

| | | |
|---|---|---|
| MM. | A.LEDOUX | Zoologie |
| | J.MALGRAS | Hygiène |
| | G.DIRHEIMER | Sciences appliquées |

Maîtres de conférences :

| | | |
|---|---|---|
| MM. | Ch.F.LAPP | Sciences physico-chimiques |
| | L.JUNG | Physique |
| | C.MATHIS | Pharmacie galénique |
| | A.STAHL | Biochimie pharm. et technique |

Maître de conférences honoraire : M. E.COLLARD.

Cours complémentaires :

| | | |
|---|---|---|
| MM. | BOEGLIN | Gestion et Comptabilité pharm. |
| | GREGOIRE | Législation pharmaceutique |

Chefs de travaux pratiques :

| | | |
|---|---|---|
| Mme | M.KRISTENSEN-REH | Chimie |
| Mme | N.OURISSON-HEILIGENSTEIN | Physiologie végétale |
| MM. | Ch.ROMOND | Bactériologie |
| | P.LAUGEL | Chimie |
| Mme | D.WENCKER-SCHAELDERLÉ | Physique et Mathématiques |
| M. | C.G.WERMUTH | Chimie |
| Mlle | C.ASSENMACHER (délégué dans les fonctions) | Chimie |
| MM. | R.ANTON. . . ( " " " " ) | Essais de médicaments |
| | J.J.BEFORT . . ( " " " " ) | Anatomie et Histologie |
| | Y.CHAMBRON . . ( " " " " ) | Chimie biologique |
| | D.GÉRARD . . . ( " " " " ) | Physique |
| | B.HORB . . . . ( " " " " ) | Parasitologie et Histologie |
| | H.LAMI . . . . ( " " " " ) | Physique |
| | J.SAMSEL . . . ( " " " " ) | Biologie animale |
| | J.P.SCHMITT. . ( " " " " ) | Pharmacie galénique |

# ÉTUDE DE QUELQUES ENZYMOPATHIES ÉRYTHROCYTAIRES

---

## A PROPOS DE SEPT CAS ÉTUDIÉS EN ALSACE

---

A MA FEMME,

A MES PARENTS,

dont le dévouement m'a permis de me consacrer à ce travail.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma plus profonde affection et de ma plus grande reconnaissance.

A MON FRÈRE,

En témoignage de mon estime et de mon affection.

A MES GRANDS-PARENTS,

A MES BEAUX-PARENTS,

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS,

Je dédie cette thèse.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547007_0012

A MON MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur P.MÉTAIS

Professeur de Chimie biologique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

qui durant ces nombreuses années d'enseignement, m'a fait découvrir et apprécier cette merveilleuse Science qu'est la Biochimie. Qu'il veuille bien trouver dans l'accomplissement de ce travail, le témoignage de mon amitié et de mon plus profond respect ainsi que ma reconnaissance pour les conseils et les directives qu'il n'a cessé de me prodiguer et sans lesquels ce travail n'aurait pu être mené à son terme.

AUX MEMBRES DE MON JURY

Monsieur le Professeur P.CORDIER

Professeur de Pharmacie Chimique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Chevalier de la Légion d'Honneur

Monsieur André STAHL

Maître de conférences de Biochimie pharmaceutique
et technique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur le Professeur J.JUIF

Professeur Agrégé à la Clinique Infantile
des Hospices Civils de Strasbourg

En hommage respectueux.

A Monsieur le Docteur Ch.LAUSECKER

Médecin-Chef de Pédiatrie
au Centre Hospitalier L.Pasteur de Colmar.

A Monsieur le Docteur H.HARTLEYB

Chef de Service de la Clinique Pédiatrique
au Centre Hospitalier L.Pasteur de Colmar

A Monsieur le Professeur C.W.PARR

Professeur au London Medical College

Nous les remercions vivement pour l'intérêt et la contribution qu'ils ont bien voulu nous apporter tout au long de nos recherches, avec la gentillesse et la simplicité qui les caractérisent.

Qu'ils trouvent dans ces quelques mots, toute notre gratitude.

A Monsieur le Professeur J.WARTER

Professeur à la Faculté de Médecine
de Strasbourg

Directeur de la Clinique Médicale A

Chevalier de la Légion d'Honneur

Nous le remercions vivement pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire.

Qu'il trouve ici l'assurance de notre estime et de notre reconnaissance.

Nous remercions enfin la LIGUE NATIONALE FRANCAISE CONTRE LE CANCER, pour la Bourse de recherche qu'elle a bien voulu nous accorder pour la poursuite et la réalisation de ce travail.

## PRINCIPALES ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LE TEXTE

G6PD : glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

6PGD : 6-phosphogluconate-déshydrogénase.

LDH : lactico-déshydrogénase.

GSH : glutathion réduit.

GSSG : glutathion oxydé.

ATPase : adénosine-triphosphatase.

NADPase : nicotinamide-adénine-diphosphatase.

ATP : adénosine-triphosphate.

ADP : adénosine-diphosphate.

AMP : adénosine-monophosphate.

GTP : guanosine-triphosphate.

GDP : guanosine-diphosphate.

GMP : guanosine-monophosphate.

UDPG : uridine-diphosphogalactose.

NAD : nicotinamide-adénine-dinucléotide oxydé (anciennement DPN).

$NADH_2$ : nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (anciennement DPNH).

NADP : nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate oxydé (anciennement TPN).

$NADPH_2$ : nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduit (anciennement TPNH).

FAD : flavine-adénine-dinucléotide oxydé.

$FADH_2$ : flavine-adénine-dinucléotide réduit.

$H_2O_2$ : peroxyde d'hydrogène.

$HbO_2$ : oxyhémoglobine.

$Na^+$ : sodium, $K^+$ : potassium, $Rb^+$ : rubidium, $Cs^+$ : césium, $Li^+$ : lithium, $Mg^{++}$ : magnésium, $Ca^{++}$ : calcium, $Ba^{++}$ : baryum, $Zn^{++}$ : zinc, $Pb^{++}$ : plomb, $Ni^{++}$ : nickel.

EDTA : sel de sodium de l'acide éthylène-diamine-tétracétique.

---

# I N T R O D U C T I O N

Les enzymopathies érythrocytaires font partie d'un groupe d'affections longtemps méconnues, mais qui grâce aux progrès récents de la biochimie représentent aujourd'hui une entité nosologique et pathologique bien définie, au même titre que les anomalies liées à la présence d'une hémoglobine anormale, les anémies hypochromes ou les anémies mégaloblastiques.

Il faut remonter à 1902 pour trouver dans la littérature la première description faite par WIDAL et RAVAUT d'une anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire, mais à cette époque cette description ne rencontre que peu d'intérêt et cette anémie est alors confondue avec la sphérocytose congénitale ou maladie de Minkowsky-Chauffard.

En 1926, CORDES observe des anémies hémolytiques aiguës chez des sujets américains de race noire traités par la pamaquine, mais cet auteur attribue alors l'hémolyse à un mécanisme antigénique ou toxique.

Ce chapitre de l'hématologie n'a vraiment vu le jour qu'il y a une quinzaine d'années, grâce aux travaux de BEUTLER puis de ALVING et de DERN. En 1955 ces auteurs étudient pour la première fois de façon précise les modalités de l'hémolyse déclenchée chez certains sujets de race noire après absorption de médicaments antipaludéens tels la primaquine. Ils démontrent alors que l'anomalie responsable de l'hémolyse intéresse le globule lui-même et que les hématies sont d'autant plus sensibles à la primaquine qu'elles sont plus âgées. Ils définissent par conséquent le caractère moléculaire de l'affection.

Enfin CARSON en 1956 démontre que cette anomalie métabolique est dû au déficit d'un enzyme du métabolisme glucidique: la glucose-6-phosphate-déshydrogénase. C'est là la première description d'une anémie hémolytique par déficience enzymatique rencontrée dans le globule rouge. En 1958, SANSONE, LARIZZA et BRUNETTI, rattachent le favisme au même mécanisme biochimique.

Par la suite de nombreux auteurs, et en particulier LÖHR et WALLER, PRANKERD, TANAKA, ont précisé et démontré l'existence des autres enzymes de la glycolyse. L'essor pris par l'enzymologie érythrocytaire a permis d'identifier jusqu'ici les déficits d'une quinzaine de variétés d'enzymes pour la plupart congénitaux : glucose-6-phosphate-déshydrogénase, 6-phosphogluconate-déshydrogénase, hexokinase, triose-phosphate-isomérase, diphosphoglycératemutase, pyruvate-kinase, adénosine-triphosphatase, glutathion-réductase, glutathion-synthétase, diaphorase, cholinestérase, catalase, galactose-1-phosphate-uridyl-transférase, galoctokinase. Certains de ces déficits n'ont

aucune traduction clinique, d'autres ne sont que le témoignage de la diffusion d'un déficit enzymatique important pour certains métabolismes viscéraux, mais non pour l'hématie tel celui de la galactose-1-phosphate-uridyl-transférase. Enfin les derniers et ceux que nous nous proposons d'étudier dans cet exposé sont susceptibles d'entraîner des manifestations hématologiques. Ce sont essentiellement des enzymes intéressant la dégradation du glucose, les systèmes d'oxydo-réduction et les enzymes propres au stroma érythrocytaire.

---

# PREMIERE PARTIE

## LE MÉTABOLISME DU GLOBULE ROUGE

---

## Chapitre I

## MÉTABOLISME DU GLOBULE ROUGE

Le globule rouge peut être considéré comme une cellule en survie. Au cours de sa maturation, cette cellule a perdu progressivement son noyau, ses ribosomes, son appareil de Golgi, ses mitochondries et elle sera donc incapable de synthétiser l'acide désoxyribonucléique, l'acide ribonucléique, les protéines, les lipides et l'hémoglobine. Elle a aussi perdu la plus grande partie de la chaîne des transporteurs d'électrons et la presque totalité des enzymes du cycle tricarboxylique.

Tableau I

Modifications biochimiques au cours de la maturation du globule rouge.

| | Erythroblastes | Réticulocytes | Erythrocytes |
|---|---|---|---|
| Synthèse de l'ADN | + | 0 | 0 |
| Synthèse de l'ARN | + | + | 0 |
| Synthèse des protéines | + | + | 0 |
| Synthèse des lipides | + | + | ± |
| Synthèse de l'hème | + | + | 0 |
| Synthèse des nucléotides | + | + | ± |
| Glycolyse anaérobie | + | + | + |
| Voie des pentoses | + | + | + |
| Cycle de Krebs | + | + | 0 |
| Système du cytochrome | + | + | 0 |

L'érythrocyte apparaît donc comme une cellule presque morte et cependant sa durée de vie est encore de 120 jours. Aussi pour pouvoir mener à bien son rôle capital de transporteur d'oxygène et d'anhydride carbonique, la nature lui a donné une "ration de survie" composée essentiellement d'un équipement enzymatique, grâce auquel il assure la transformation du glucose en acide lactique et produit son énergie indispensable. Au cas où l'un des enzymes de la chaîne métabolique vient à manquer, le métabolisme du globule est perturbé, ce qui se traduit souvent par l'apparition d'une anémie hémolytique.

Le globule rouge est un petit sac rempli d'une solution concentrée d'hémoglobine responsable du transport de l'oxygène nécessaire à la vie des tissus. Ce sac ou stroma a une structure particulière; ce n'est pas une paroi inerte puisqu'on peut encore y observer un renouvellement de ses constituants. Les phospholipides, le cholestérol, les glycolipides, forment cette membrane et sont maintenus en place, soudés entre eux par la présence de protéines fibrillaires qui portent des groupements mucopolysaccharides caractéristiques des groupes sanguins. A ce stroma se trouvent associées plusieurs activités enzymatiques, dont une ATPase qui est en relation avec le transport actif des ions sodium et potassium. Il y existe encore d'autres enzymes : phosphatases, acétylcholinestérase, nucléotide phosphorylase, catalase, anhydrases carboniques, mais leur rôle est moins bien défini et des recherches sont encore nécessaires pour savoir si ces enzymes contribuent au maintien de la structure du stroma ou s'ils dirigent les échanges du globule rouge.

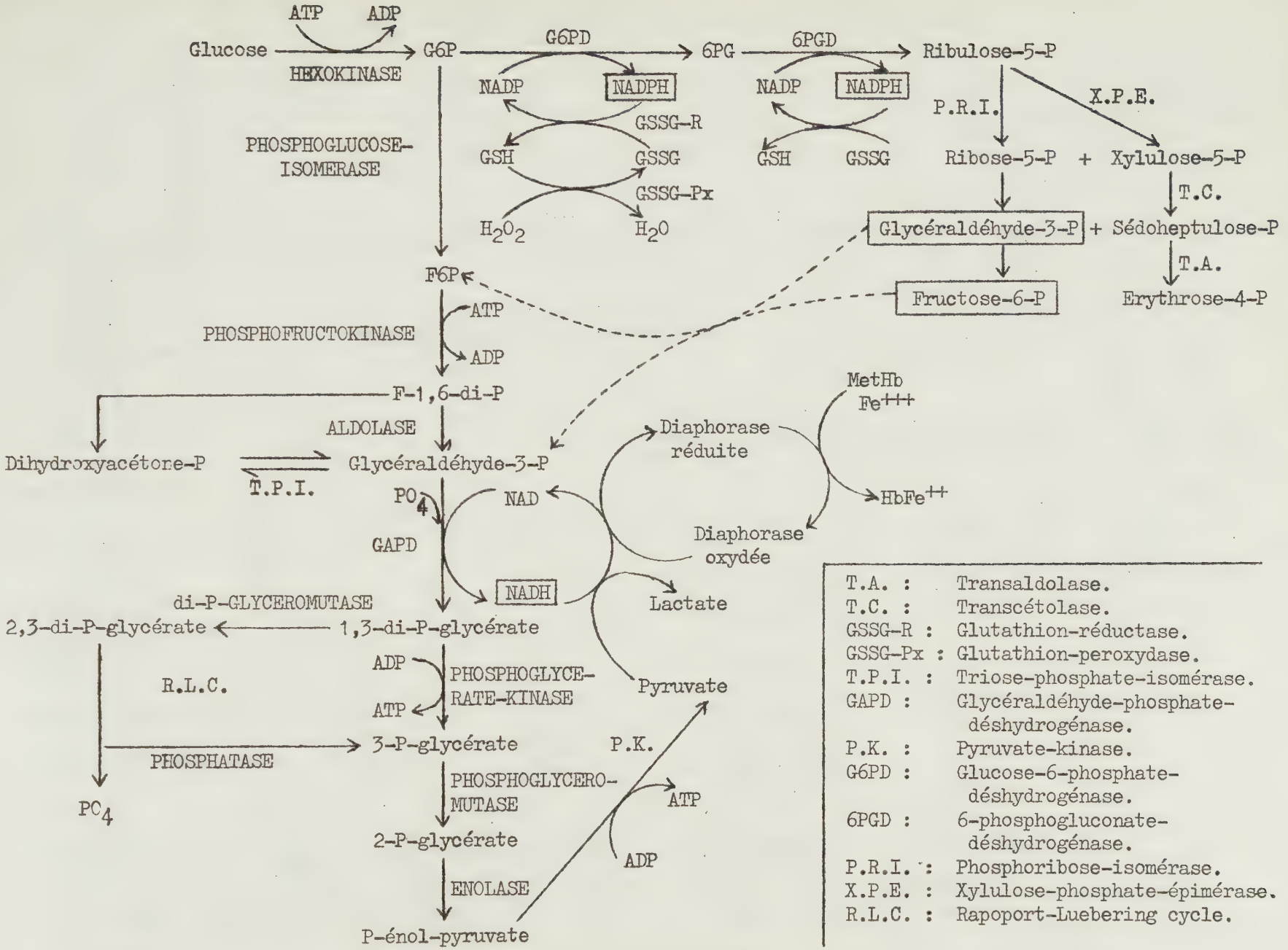
A l'intérieur de ce sac tout semble orienté vers la conservation de la molécule d'hémoglobine. Cette cellule ne respire pas : en effet son $QO_2$ est de 0,02 contre 1 pour le réticulocyte et 10 à 30 pour la plupart des tissus. Les enzymes qui s'y trouvent sont des enzymes du catabolisme glucidique ou du métabolisme des nucléotides. Le globule rouge conserve donc son intégrité cellulaire en utilisant le glucose comme principale source d'énergie. Dans certaines circonstances particulières il pourra aussi consommer le fructose, le galactose ou le mannose. Tous ces sucres seront alors dégradés en acide lactique. Le globule utilisera donc essentiellement la glycolyse anaérobie.

## VOIE GLYCOLYTIQUE d'EMBDEN-MEYERHOF.

La description des différentes étapes de la glycolyse est rattachée aux noms d'illustres biochimistes dont il faut citer BUCHNER, HARDEN-YOUNG, NEUBERG, WARBURG (1). L'accumulation de l'acide lactique concomitante de la disparition du glucose ressort d'un mécanisme essentiellement anaérobie. Cette voie est certainement la plus importante utilisée par le globule rouge, car on sait depuis les travaux de BIRD (2) que la quantité d'acide lactique formé correspond à 93,7 % du glucose utilisé. L'examen de cette voie métabolique amène aux conclusions suivantes :

1) Gain de 2 ATP :

Ce gain représente le bilan énergétique de la voie d'EMBDEN-MEYERHOF. Pour le démarrage de la glycolyse, deux molécules




T.A. : Transaldolase.
T.C. : Transcétolase.
GSSG-R : Glutathion-réductase.
GSSG-Px : Glutathion-peroxydase.
T.P.I. : Triose-phosphate-isomérase.
GAPD : Glycéraldéhyde-phosphate-déshydrogénase.
P.K. : Pyruvate-kinase.
G6PD : Glucose-6-phosphate-déshydrogénase.
6PGD : 6-phosphogluconate-déshydrogénase.
P.R.I. : Phosphoribose-isomérase.
X.P.E. : Xylulose-phosphate-épimérase.
R.L.C. : Rapoport-Luebering cycle.

Fig. 1 - Métabolisme du glucose dans le globule rouge.

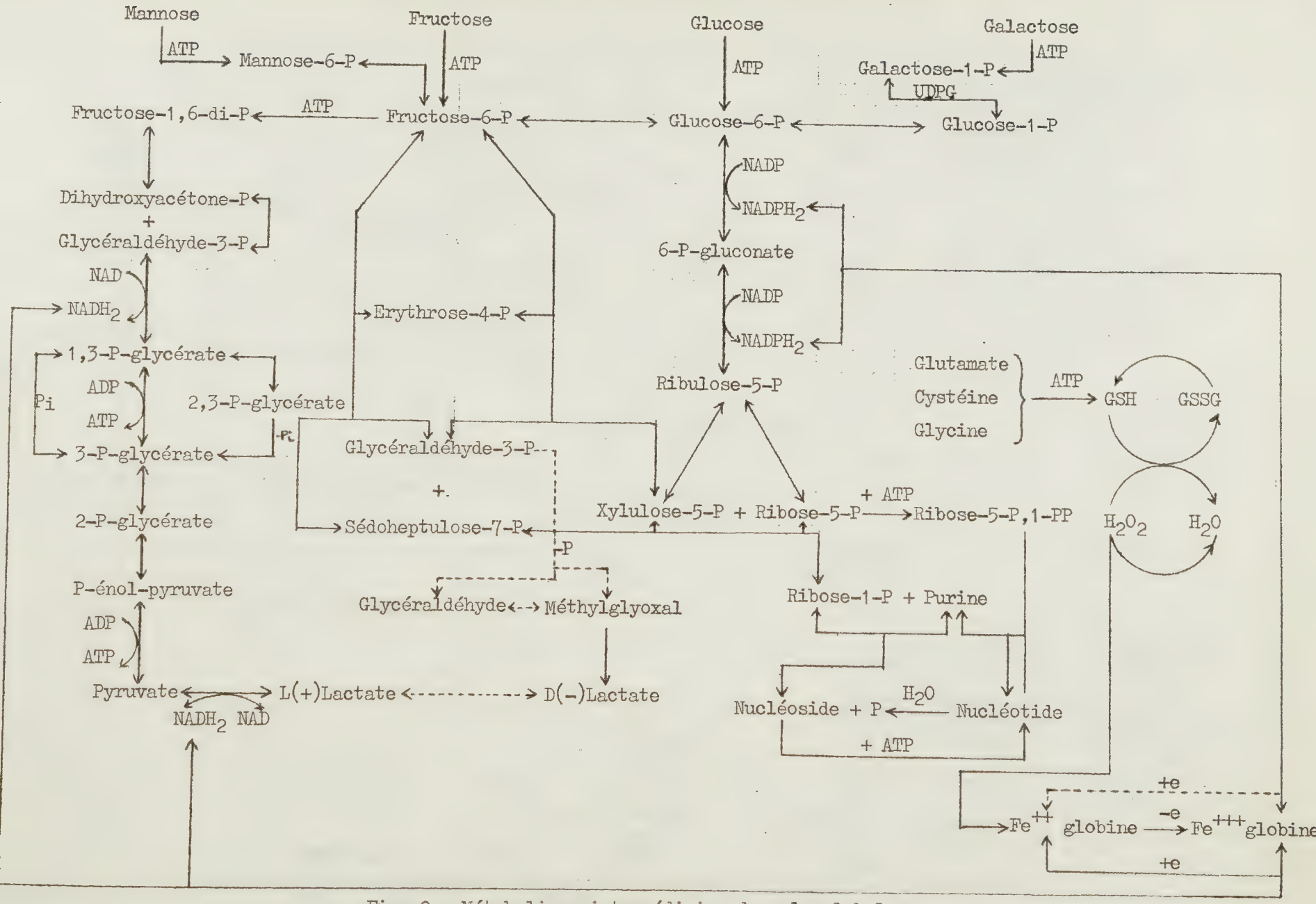



Fig. 2 - Métabolisme intermédiaire dans le globule rouge.

d'ATP sont nécessaires par molécule de glucose, l'une pour la phosphorylation du glucose en glucose 6-phosphate par l'hexokinase, l'autre pour la phosphorylation du fructose 6-phosphate en fructose diphosphate par la phosphofructokinase. Au contraire la phosphorylation du phosphoglycéraldéhyde en 1,3-diphosphoglycérate se fait à partir des phosphates minéraux et ne réclame pas d'ATP. L'ATP est resynthétisé à partir de l'ADP au cours de deux réactions successives portant sur le même triose : déphosphorylation de l'acide 1,3-diphosphoglycérique et déphosphorylation de l'acide phosphoénolpyruvique : ainsi se reforment 2 molécules d'ATP par triose, soit en fait 4 par hexose, d'où un gain final de 2 ATP par glucose consommé.

2) Réduction du NAD et formation de $NADH_2$ :

La réduction du nicotinamide-adénine-dinucléotide se fait lors de la transformation du phosphoglycéraldéhyde en acide 3-phosphoglycérique par une déshydrogénase spécifique. La réoxydation de ce même coenzyme se fait lors de la réduction de l'acide pyruvique en acide lactique, mais une faible partie du $NADH_2$ subsiste permettant l'action capitale de la diaphorase dans la réduction de la methémoglobine.

3) Cycle de RAPOPORT-LUEBERING (3) :

Ce shunt se situe en dérivation de la chaîne normale au niveau de l'oxydation du triose phosphate. L'existence de ce cycle a été préssentie par la présence dans l'érythrocyte du 2,3-diphosphoglycérate qui s'accumule à un taux élevé. Il représente en effet plus de 90 % des esters phosphoriques contenus dans l'acido-soluble. Cet ester est produit à partir du 1,3-diphosphoglycérate en présence d'une mutase. Ainsi la phosphoglycératekinase est peu active et le passage par cette voie aboutit au 3-phosphoglycérate sans production d'ATP. En effet le globule rouge a besoin de très peu d'ATP, puisqu'il n'est pas l'objet de synthèse importante. Ce métabolite constitue en outre une réserve glucidique et énergétique non négligeable, car s'il y a déplétion glucidique érythrocytaire, il peut être diphosphorylé en 3-phosphoglycérate et rejoindre ainsi la voie principale : c'est donc le phosphagène du globule rouge qu'il utilisera en cas de besoin et en absence de glucose.

## VOIE GLYCOLYTIQUE DES PENTOSES.

Cette seconde voie glycolytique dénommée le plus souvent shunt des hexoses monophosphates a été découverte par DICKENS et HORECKER (4). Cette voie est dite oxydative, car sa première étape est sous la dépendance d'une déshydrogénase capable

d'oxyder spécifiquement le glucose 6-phosphate en acide 6-phosphogluconique, mais elle n'entraine pas de consommation d'oxygène car le $NADPH_2$ formé ne cède pas ses hydrogènes à la chaîne des transporteurs. Les travaux de BIRD (2) avaient montré que la quantité d'acide lactique formé correspondait à 93,7 % du glucose utilisé. Il y avait donc 6,3 % du glucose qui avait disparu et qui devait être engagé dans une autre voie. Grâce à l'utilisation du $C_{14}$, il a pu être démontré qu'effectivement 8 % du glucose dégradé empruntait le shunt de HORECKER, la voie principale d'EMBDEN-MEYERHOF, en utilisant 92 %. Au total les diverses réactions de la glycolyse oxydative vont aboutir à la formation de deux molécules de $NADPH_2$. Le rôle de ce coenzyme est considérable puisqu'il cède ses hydrogènes au glutathion, maintenant ainsi le taux de glutathion réduit. L'état d'oxydation du glutathion concourt au maintien du potentiel réducteur intra-érythrocytaire, c'est-à-dire que le $NADPH_2$ intervient de façon primordiale pour protéger l'hémoglobine et les protéines enzymatiques et structurales, contre l'oxydation. La chaîne des pentoses, assurant la seule source de $NADPH_2$ dans l'érythrocyte, a donc une importance capitale pour son potentiel réducteur.

En conclusion, ces deux voies glycolytiques permettent au globule rouge d'une part de conserver un potentiel réducteur suffisant afin de maintenir à l'état réduit l'hémoglobine et les groupes SH de certains enzymes et protéines, et d'autre part d'apporter l'énergie nécessaire au respect de l'intégrité de sa forme biconcave, au maintien d'un certain gradient de sodium et potassium vis-à-vis du plasma et aux faibles besoins réclamés par les quelques synthèses effectuées. L'érythrocyte pourra alors jouer son rôle qui est celui de transport d'oxygène des poumons aux tissus et du transfert du $CO_2$ des tissus aux poumons.

## LES RÉDUCTASES DU GLOBULE ROUGE.

A côté de quelques dizaines d'enzymes des chaînes de dégradation, on trouve dans le globule rouge plusieurs réductases qui utilisent les coenzymes réduits. Les mieux connues sont la glutathion réductase, deux fois plus active avec le $NADPH_2$ qu'avec le $NADH_2$, qui maintient le glutathion à l'état réduit et les diaphorases ou methémoglobines réductases qui contribuent à transformer en hémoglobine la methémoglobine. Cette réaction se produit surtout grâce au $NADH_2$, mais aussi avec le $NADPH_2$ en présence d'un accepteur d'électrons : bleu de méthylène in vitro, peut être acide ascorbique in vivo. C'est sur l'action de ces enzymes dépendant des coenzymes réduits, que sont basés certains tests dits de stabilité du glu-

tathion. Ce test dû à BEUTLER (5) est d'une grande utilité pour le diagnostic des anémies hémolytiques par déficience enzymatique. Les anomalies des methémoglobine-réductases conduisent à une methémoglobinémie, puisque ces enzymes représentent le système normal de récupération de l'hémoglobine, qui sous l'influence d'oxydants divers tend à s'oxyder en methémoglobine et même en choléglobine. Ce sont d'ailleurs dans ces conditions qu'apparaissent les corps de HEINZ, ponctuations bleu-violacées colorées au violet de méthyle et dues à la présence de ces dérivés d'oxydation.

AUTRES ENZYMES.

1) Cycle tricarboxylique :

Malgré la disparition de ce cycle dans le globule rouge adulte, on a pu prouver la persistance de certaines séquences, et c'est ainsi qu'on a pu montrer l'existence d'au moins quatre enzymes appartenant à ce cycle et qui sont respectivement la fumarase, la malicodéshydrogénase, l'aconitase et l'isocitrique-déshydrogénase. La présence des deux derniers enzymes est l'apanage des récentes observations qui ont montré que les globules rouges étaient capables d'utiliser in vitro l'acide citrique pour la formation d'acide $\alpha$-cétoglutarique. D'autre part on a rapporté que l'érythrocyte pouvait utiliser l'$\alpha$-cétoglutarate d'origine exogène pour la formation d'acide glutamique grâce à une réaction de transamination. SPEAR et SASS (6) ont en outre apporté une preuve supplémentaire dans la synthèse du glutathion. En effet, en remplaçant l'acide glutamique marqué au $C_{14}$ par l'acide $\alpha$-cétoglutarique marqué, la vitesse d'incorporation de ce dernier composé dans le tripeptide est identique à celle de l'acide glutamique. Il y a donc bien eu transamination.

2) Catalase :

En 1947, TAKAHARA (7), appliquant une solution de peroxyde d'hydrogène sur la muqueuse buccale d'un malade, s'apercevait qu'il n'y avait pas eu dégagement d'oxygène, mais il apparaissait au contraire une coloration noire des tissus environnants. Depuis on a décrit des cas semblables en Suisse et en Israël. Le rôle de cet enzyme n'est pas encore élucidé. Peut-être constitue-t-il un système de protection de l'hémoglobine ?

3) Glyoxalase :

Récemment BONSIGNORE et coll.(8) ont pressenti l'existence d'un tel enzyme. Ils remarquent en effet que la D-L-glycéraldéhyde ainsi que le glycéraldéhyde 3-phosphate sont dégradés

et transformés en lactate dans le globule rouge par un mécanisme différent de la phosphorylation. Le méthylglyoxal semblerait être l'un des composés intermédiaires. Ceci expliquerait ce problème tant controversé de la synthèse du méthylglyoxal et le rôle physiologique de la glyoxalase qui est particulièrement active dans le globule rouge.

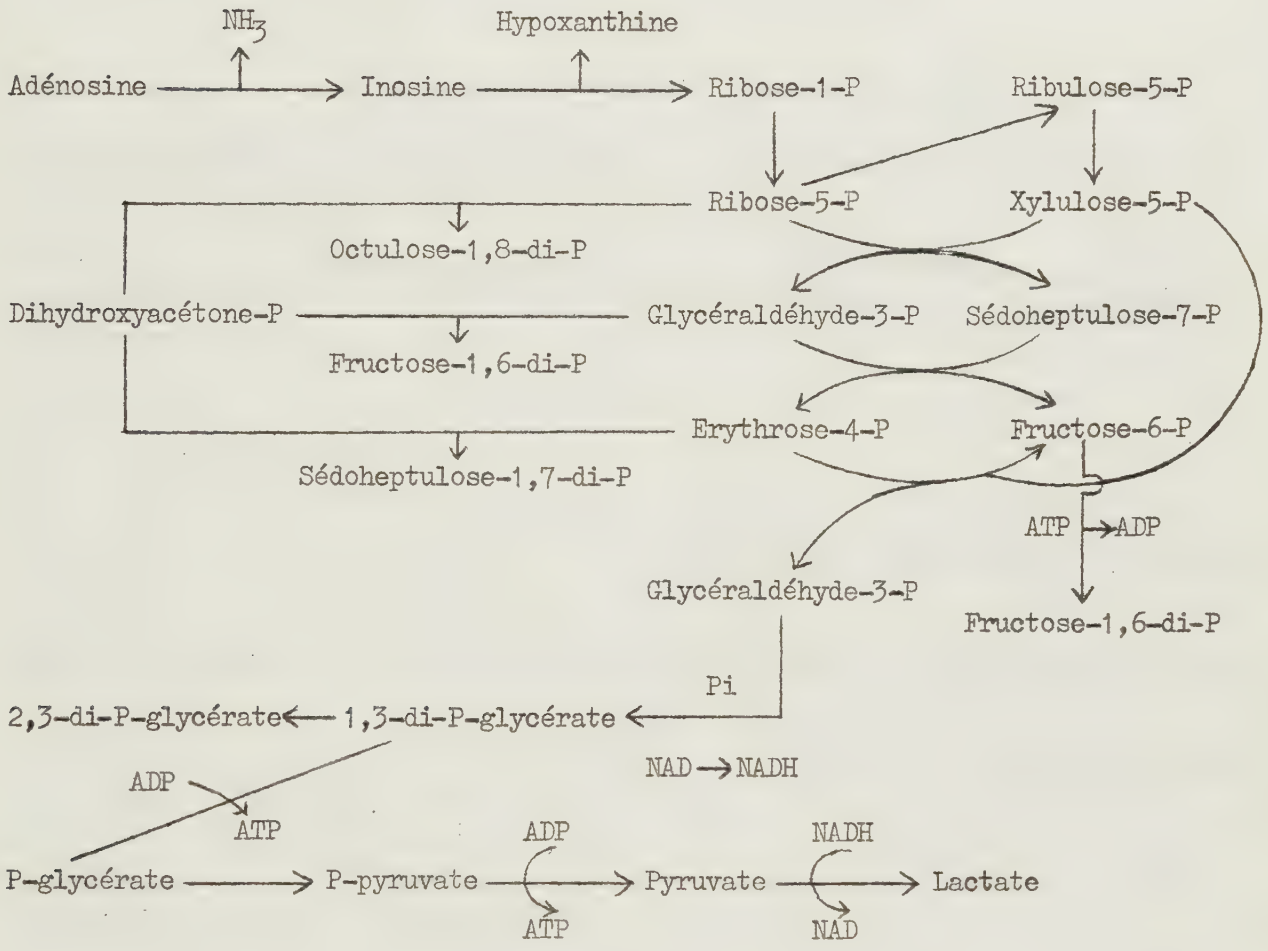
4) Galactose-1-phosphate-uridyl-transférase :

Cet enzyme n'a qu'un intérêt mineur dans le métabolisme du globule rouge. Il joue cependant un rôle très important en biochimie clinique, car sa détermination permet de poser le diagnostic des galactosémies congénitales.

MÉTABOLISME DU RIBONUCLÉOSIDE.

C'est à BARTLETT et BUCOLO (9) que revient le mérite d'avoir précisé nos connaissances en ce qui concerne le métabolisme du ribonucléoside purique dans les globules rouges humains. Les résultats schématisés dans la figure 3 peuvent se résumer comme suit : les composés intermédiaires de ce métabolisme ont été isolés des érythrocytes après incubation de ceux-ci pendant deux heures à 37°C en présence d'inosine, d'inosine + adénine ou d'adénosine. Le métabolisme de l'inosine et de l'adénosine conduit à une augmentation importante de fructose-diphosphate et de triose-phosphate, mais n'entraîne qu'une variation minime de la concentration des phosphoglycérates ou des hexoses monophosphates. Parmi les composés apparaissant lors des premiers temps du métabolisme du ribose, le ribose-5-P apparaît en quantité importante, alors que les cétopentoses-5-P et le sédoheptulose-7-P n'apparaissent qu'à des concentrations peu importantes. Par contre, ces auteurs ont mis en évidence des composés jusque là inconnus tels le sédoheptulose-1,7-di-P, l'octulose-1,8-di-P et le fructose-1-P, le sédoheptulose et l'octulose étant vraisemblablement formés par une réaction utilisant la dihydroxyacétone-P avec respectivement l'érythrose-4-P et le ribose-5-P et catalysée par l'aldolase. L'incubation des globules rouges en présence d'inosine + adénine ou d'adénosine produit une plus grande quantité d'ATP que l'incubation en présence d'inosine seule. L'explication peut être donnée par le fait que l'incubation en présence d'inosine produit une grande quantité de ribose-1,5-di-P, alors que ce n'est pas le cas avec l'inosine + adénine. On peut donc en conclure que le ribose-di-P est un produit de dégradation du 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate, ce dernier étant déplacé en présence d'adénine lors de la synthèse de l'ATP.

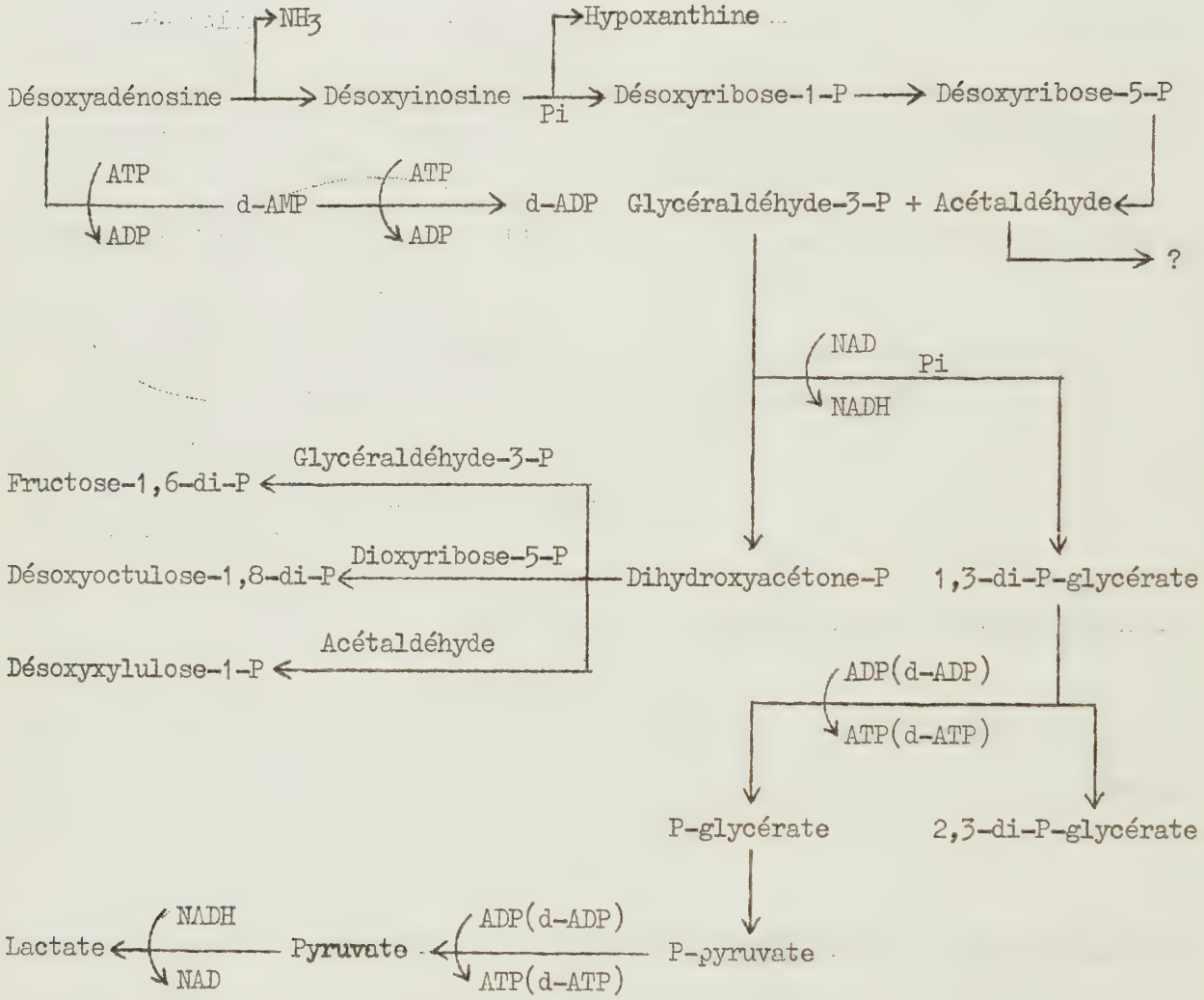
Fig. 3 - Métabolisme du ribonucléoside dans le globule rouge.




## MÉTABOLISME DU DÉSOXYRIBONUCLÉOSIDE.

L'investigation de ce chapitre revient encore à BARTLETT (10). En opérant dans les mêmes conditions que précédemment, il arrive aux résultats suivants : le métabolisme de la désoxyinosine ou de la désoxyadénosine aboutit à l'accumulation de fructose-di-P, de triose-P et de désoxyribose-5-P. Une fois de plus cet auteur met en évidence des composés encore inconnus : le 5-désoxyxylulose-1-P et le 2-céto-5-désoxyoctulose-1,8-di-P. Ces deux produits proviendraient aussi de l'action de la dihydroxyacétone-P sur l'acétaldéhyde et le désoxyribose-5-P, réaction catalysée par l'aldolase. Enfin l'incubation de globules rouges en présence de désoxyadénosine, entraîne la production d'une quantité assez importante de d-ADP et de d-ATP.

Fig. 4 - Métabolisme du désoxyribonucléoside dans le globule rouge.



## Chapitre II

## ÉVOLUTION BIOCHIMIQUE DU GLOBULE ROUGE

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le globule rouge est une cellule qui se trouve lachée dans le torrent circulatoire munie d'un équipement métabolique qu'elle utilisera pour mener à bien les fonctions qui lui sont dévolues. Cependant si on examine ce globule rouge à des périodes successives de son existence, on s'aperçoit que ses propriétés changent, que certains composés de son équipement enzymatique ou de sa membrane disparaissent ou s'atténuent, alors que d'autres apparaissent. C'est précisément cet aspect dynamique de l'érythrocyte que nous étudierons dans ce chapitre.

Les études faites par LÖHR (11) sur le taux des enzymes dans les cellules jeunes par différence de fragilité osmotique ou de densité, ont montré des activités enzymatiques variant avec l'âge de la cellule, le taux étant d'autant plus élevé que la cellule est plus jeune. Or la proportion de cellules jeunes est relativement importante chez le nouveau-né. Les réticulocytes au cours de la période néonatale sont trois à quatre fois plus nombreux que chez l'adulte. Ces taux se maintiennent élevés pendant trois jours et n'atteignent la valeur de l'adulte qu'au deuxième ou troisième mois. De nombreux auteurs se sont intéressés à ce problème dont entre autre BARTHELMAI (12), WITT et HERDAN (13), POWELL (14) et CHAPMAN (15). KAPLAN (16) trouve une activité de la G6PD de 144 % pour un nouveau-né de 0 à 3 jours par rapport à l'adulte, de 108 % de la 3e à la 9e semaine et de 125 % de la 10e à la 17e semaine. La légère baisse entre la 3e et la 9e semaine serait due à la diminution de l'érythropoïèse dans les premières semaines de la vie. FORNAINI (17) a particulièrement bien étudié ces modifications biochimiques au cours de la vie de l'érythrocyte. Les résultats peuvent se résumer comme suit : l'aspect des globules rouges est différent de celui des adultes ainsi que la composition lipidique de la membrane. La consommation du glucose ainsi que du galactose est considérablement augmentée, de même que la teneur en ATP et en ADP de l'hématie. On relève une nette augmentation des activités enzymatiques dont celles de l'hexokinase, de la galactokinase, de la pyruvate-kinase, de l'énolase, de l'aldolase, de la G6PD, de la 6PGD, de la lacticodéshydrogénase, de la 3-P-glycéraldéhyde-déshydrogénase, de la glutathion-réductase, de la lipase et de l'amylase, de la glutamate-pyruvate et de la glutamate-oxaloacétate-transaminase.

Tableau II

Enzymes érythrocytaires (Valeurs normales).

| | COTTE et coll. | | LÖHR |
|---|---|---|---|
| | Prématurés | Enfants 2 mois à 1 an | Adultes |
| Hexokinase | 4 ± 1,9 | 2,2 ± 0,85 | 1,7 ± 0,25 |
| Phosphoglucomutase | 3,7 ± 1,6 | 5 ± 1,7 | 7 ± 0,8 |
| Glucose-phosphate-isomérase | 130 ± 7,5 | 99 ± 17 | 89 ± 7 |
| Fructose-6-phosphate-kinase | 16,5 ± 5 | 18,5 ± 5 | 17,7 ± 2,2 |
| Aldolase | 7,5 ± 2 | 7 ± 2 | 5 ± 0,5 |
| Triose-phosphate-isomérase | 794 ± 223 | – | – |
| Glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase | 394 ± 136 | 342 ± 95 | 413 ± 52 |
| 3-phosphoglycéro-1-kinase | 793 ± 155 | 554 ± 115 | 512 ± 59 |
| Phosphoglycéromutase | 68 ± 24 | 41 ± 14 | 75 ± 109 |
| Enolase | 77 ± 20 | 38 ± 10 | 37,5 ± 3,7 |
| Pyruvate-kinase | 60 ± 22 | 43 ± 15 | 417 ± 6,3 |
| Lactico-déshydrogénase | 370 ± 116 | 278 ± 85 | 270 ± 36,7 |
| Glucose-6-phosphate-déshydrogénase | 34 ± 8,5 | 15,9 ± 3 | 17,1 ± 2,3 |
| 6-phospho-gluconate-déshydrogénase | 14 ± 5 | 12 ± 4 | 7,7 ± 0,8 |
| Glutathion-réductase | 15 ± 5 | 14 ± 4 | 9,7 ± 1,3 |
| Isocitrate-déshydrogénase | 2,8 ± 1,5 | 2,5 ± 1,1 | 2,1 ± 0,3 |
| Malate-déhydrogénase | 408 ± 117 | 332 ± 98 | 244 ± 36 |
| Myokinase | 390 ± 84 | 383 ± 164 | 107 ± 85 |
| Magnésium-ATPase | 54 ± 14 | 58 ± 13 | 33 ± 3,8 |

Les résultats sont exprimés en Unités Internationales / $10^{11}$ érythrocytes.

1 Unité Internationale = 1 micromole de substrat transformée/minute, à 25°C, à pH 7,5.

A l'inverse, les activités de la phosphofructokinase, de la glutathion-peroxydase, de la catalase, de la diaphorase, de l'anhydrase carbonique et de la cholinestérase, se trouvent diminuées.

COTTE et coll. (18) ont effectué de nombreux bilans chez le nouveau-né, le nourrisson et même le prématuré. Les résultats sont rapportés dans le tableau II. Si l'on rapproche ces résultats des quelques-uns obtenus à la naissance et dans les semaines qui suivent, on constate que le nouveau-né à la naissance et jusqu'à une semaine, possède des activités enzymatiques augmentées dans les mêmes proportions que le prématuré. Ces activités restent encore plus ou moins augmentées jusqu'à deux mois où elles prennent leurs valeurs définitives.

Au bout de cent jours environ, lorsque le globule rouge aura rempli toutes ses fonctions, il présentera petit à petit des signes de défaillances : toute synthèse sera définitivement abolie, il consommera ses sucres avec une beaucoup moins grande avidité, bref il finit par vivre au ralenti jusqu'au moment où il sera capté par les cellules du système réticulo-histiocytaire et exclu de la circulation générale. La sénescence du globule rouge est donc associée à de profonds changements morphologiques, physiques, chimiques et métaboliques, aussi bien qualitatifs que quantitatifs. En premier lieu sa forme tendra à devenir celle d'un sphérocyte, la membrane qui était granuleuse prendra un aspect lisse et on notera une diminution des charges électriques. Sa densité va augmenter en même temps qu'il accumulera du sodium et de l'eau; sa pression osmotique diminuera en raison de la fuite de ses métabolites intracellulaires. Ainsi de nombreux autres constituants de la cellule vont diminuer, dont la teneur en eau et en ions $K^+$ et $Ca^{++}$, les esters phosphoriques, la plupart des nucléotides (ATP, ADP, AMP, GTP, GDP et GMP), les coenzymes (NADP, UDPG) et le 2,3-diphosphoglycérate. En outre vont s'abaisser les lipides et en particulier le cholestérol et la lécithine. La composition des acides gras se verra modifiée. Le taux de méthémoglobine va augmenter, les groupements thiols vont diminuer et les caractères électrophorétiques de l'hémoglobine seront perturbés, en même temps que l'affinité de l'hématie pour l'oxygène et le chrome. Enfin, l'activité de nombreux enzymes ira en s'affaiblissant, notamment l'hexokinase, la glucosephosphate-isomérase, l'aldolase, la triose-phosphate-isomérase, la glycéraldéhyde-phosphate-déshydrogénase, la phosphoglycérate-kinase, la pyruvate-kinase, la lactico-déshydrogénase, la G6PD et la 6PGD, la transcétolase et la transaldolase, la diaphorase et la méthémoglobine-réductase, la nucléoside-phosphorylase, la cholinestérase, la catalase, la glyoxalase, le pyrophosphate et la NAD-kinase.

Pour mieux comprendre le rôle exact joué par ces différents enzymes, il convient à présent d'en étudier leurs différents aspects aussi bien physico-chimiques que biochimiques voire génétiques, afin de pouvoir les situer dans leur contexte pathologique qui est celui de l'étude des anémies hémolytiques congénitales non sphérocytaires.

---

## Chapitre III

## HEXOKINASE

Malgré de nombreuses études, l'hexokinase reste encore un enzyme fort controversé aussi bien sur le plan clinique que biochimique. Les dosages enzymatiques ont montré dans la pratique courante une nette augmentation de l'activité hexokinasique chez les prématurés et le jeune enfant, ainsi que chez l'adulte, lors des crises réticulocytaires. A partir de ces constatations, les biochimistes ont tenté de savoir pourquoi et à quoi était duecette augmentation. C'est BETKE et coll. (19) qui les premiers, en 1959, se sont penchés sur les propriétés physico-chimiques de l'enzyme à savoir l'électrophorèse en gel d'amidon à pH 8,4, la chromatographie sur DEAE-cellulose, la stabilité à la chaleur et la constante de Michaelis. Ces auteurs séparaient ainsi trois isoenzymes différents. EATON et coll. (20), en 1966, séparaient sept et même huit bandes distinctes à partir des hémolysats de globules rouges (figure 5). Le nombre de bandes ainsi que leur mobilité électrophorétique étaient en désaccord avec les résultats obtenus auparavant. Ainsi les hémolysats à partir d'hématies riches en réticulocytes étaient formés de huit bandes, réparties en zone B constituée de sept bandes plus une zone A d'une bande. HOLMES et coll. (21) reprenant les mêmes études retrouvent ces deux zones qu'ils désignent par type I et type III. Cependant en étudiant 17 nourrissons âgés de quatre jours, ils mettent en évidence une troisième bande électrophorétique que ne signalait pas EATON, et qui migre entre les types I et III. Ils la désignèrent par type II (figure 6). Les types II et III se rencontraient toujours, alors que dans certains cas le type I venait à manquer. Le type II est donc bien particulier au jeune enfant. En effet, en séparant par ultracentrifugation les hématies jeunes des hématies âgées à partir d'un sang de sujet adulte, on ne retrouve jamais le type II, ni dans les cellules jeunes, ni dans les cellules âgées, alors que les types I et III se retrouvent constamment dans les deux lots. La présence ou l'absence du type II ne serait donc pas en rapport avec les phénomènes de maturation érythrocytaire. En effet, en étudiant par hasard l'hexokinase chez un prématuré, HOLMES (21) mit en évidence ce type II en même temps qu'il signalait la teneur élevée en hémoglobine foetale. Bien plus, cet auteur étudia l'hexokinase chez une famille possédant l'hémoglobine F à l'état congénital. Dans cette famille il retrouva le type II aussi bien chez les personnes adultes que chez les enfants. La régulation de la synthèse du type II de l'hexokinase serait-elle peut-être en rapport avec celle de la chaîne $\delta$ de l'hémoglobine ? Récemment SCHRÖTER et TILLMANN (22) semblent avoir

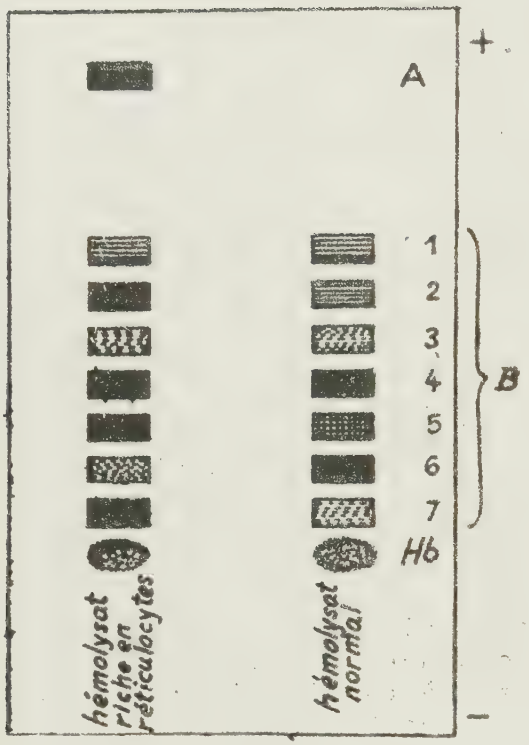



Fig. 5

Comportement électrophorétique de l'hexokinase (d'après EATON).

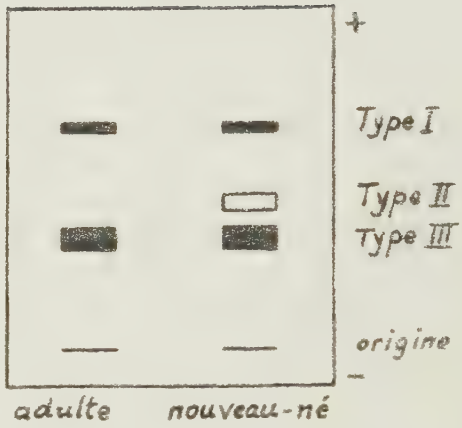



Fig. 6

Comportement électrophorétique de l'hexokinase (HOLMES et coll.).

apporté une solution à cette situation ambiguë. L'identification de l'hexokinase est délicate de par sa faible activité érythrocytaire. Grâce à une nouvelle technique, ils mettent toujours en évidence les types I et III, mais ils ne retrouvent jamais le type II. L'activité exagérée chez le nourrisson se situerait dans la zone délimitant le type I, identique à la bande B décrite par EATON. L'isozyme II décrit par HOLMES, serait un artifact dû à l'interruption de la bande B par l'hémoglobine F, cette dernière ne prenant pas la coloration de l'enzyme. En outre, la bande B d'EATON non révélée par le bleu de tétrazolium, apparaîtrait comme uniforme en lumière ultra-violette. Les isozymes de l'hexokinase se résumeraient donc ainsi à deux types I et III.

Sur le plan clinique, la situation est tout aussi confuse. En 1967, VALENTINE, OSKI et PAGLIA (23) semblent avoir identifiés un déficit primaire en hexokinase. Ce serait le premier cas mondial. Quelques mois plus tard, COTTE et coll. (18) rapportent le même déficit. Cependant, les résultats sont loin

d'être nets. Dans le cas décrit par COTTE, il s'agit du père d'un enfant chez lequel il avait trouvé un déficit en G6PD. Le taux d'hexokinase était voisin de 40 % de la normale.Mais chez cet enfant outre le déficit en G6PD, cet auteur signalait un abaissement considérable de l'hexokinase, puisque son taux n'était que de 25 % de la normale. Il s'agit donc là, soit d'un abaissement secondaire au déficit en G6PD, soit d'un déficit primitif hérité du père, soit enfin d'un déficit primitif aggravé par le déficit en G6PD.

Dans l'observation américaine, le taux de l'hexokinase chez le malade lui-même était de 60 % du taux normal et pourtant il était classé parmi les sujets homozygotes au déficit en raison des accidents hémolytiques observés. Les auteurs insistent sur le fait d'une population érythrocytaire très jeune masquant certainement un déficit plus profond. Le père et la mère sont dits porteurs hétérozygotes avec des taux d'enzymes respectivement voisins pour le premier de 60 %, pour la seconde de 80 % du taux normal. Dans l'observation de COTTE, le malade ne présentait ni anémie, ni hémolyse, ni splénomégalie. Par contre, les américains ont trouvé chez leur malade une anémie hémolytique, mais ils n'ont trouvé chez le père et le frère du malade aucune hémolyse, malgré un taux en hexokinase abaissé, abaissement surtout net chez le frère, 30 % de la normale, c'est-à-dire inférieur à celui du malade. En raison des faits cliniques et biologiques, les auteurs américains ont déclaré les divers membres de la famille explorés porteurs hétérozygotes. Cette observation peut donc prêter à discussion. Le malade de COTTE serait lui aussi hétérozygote. Le dosage de l'ATP, reflet général de la glycolyse, donne des résultats peu diminués. Un abaissement de l'hexokinase voisin de 40 % permet donc une glycolyse presque normale. La capacité de phosphorylation du glucose par l'hexokinase n'est donc pas engagée à son maximum et l'enzyme ne serait par conséquent pas un des facteurs limitants de la glycolyse.

---

## Chapitre IV

## PHOSPHOGLUCOMUTASE

L'étude de cet enzyme n'a pas d'intérêt sur le plan clinique. En effet il n'a pas été possible de décrire à ce jour un déficit quelconque, cependant cet enzyme, par son extrême polymorphisme chez l'homme, a permis d'entreprendre de sérieuses études anthropologiques, grâce à ses propriétés électrophorétiques pratiquées en gel d'amidon à pH 7,4 et déterminées par SPENCER (24).

La phosphoglucomutase est une phosphotransférase qui catalyse le transfert d'un groupement phosphoré du $C_1$ sur le $C_6$ du glucose. A l'électrophorèse l'enzyme se sépare en sept bandes désignées de a à g ainsi que le montre la figure 7. La disposition particulière de ces bandes déterminera les différents phénotypes connus qui sont actuellement au nombre de sept.

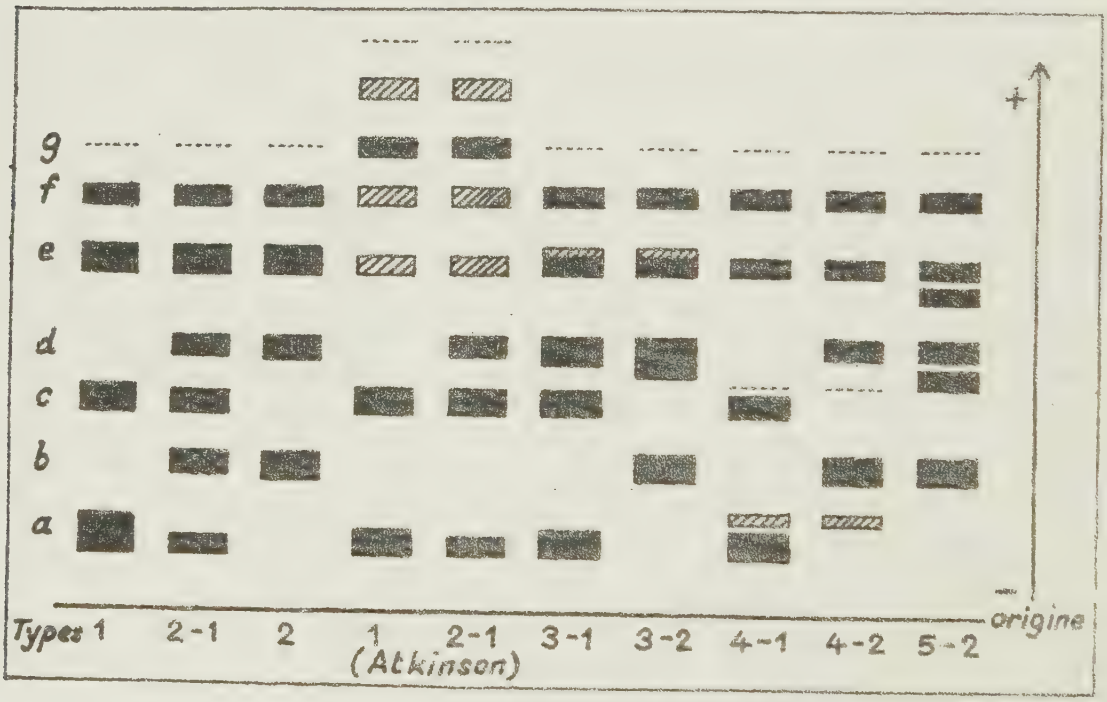



Fig. 7 - Diagramme électrophorétique des isozymes de la phosphoglucomutase (d'après HOPKINSON et HARRIS).

Trois seulement de ces phénotypes apparaissent couramment dans la race blanche. Si l'on suppose que ces trois types sont déterminés par deux gènes autosomes allèles $PGM_1$ et $PGM_2$, les génotypes homozygotes s'écriront $PGM_1$ $PGM_1$ et $PGM_2$ $PGM_2$ et le génotype hétérozygote s'écrira par conséquent $PGM_1$ $PGM_2$. L'activité de la phosphoglucomutase est inhibée par les ions $Mg^{++}$ et imidazole. Ces phénotypes diffèrent par la répartition des composants a, b, c, d. Ainsi a et c sont fréquents dans les phénotypes $PGM_1$ et $PGM_{2-1}$, alors que les composants b et d se trouvent dans les phénotypes $PGM_{2-1}$ et $PGM_2$. Ces différences de phénotypes sont dues à la présence de deux autosomes allèles $PGM_1^1$ et $PGM_1^2$. L'un des allèles préside à la formation des polypeptides communs à a et c, alors que l'autre contribue à la formation des polypeptides communs à b et d. Les trois phénotypes ne diffèrent pas les uns des autres en ce qui concerne les fractions e, f et g. Ceci suggère donc l'existence d'un autre locus portant un gène de structure et responsable de la synthèse de ces composants. L'existence de ce locus a été prouvée par la découverte de deux phénotypes rares mis en évidence dans une famille du nom de Atkinson et qui donna son nom à ces deux nouveaux isozymes (25). Les caractéristiques de cette variété Atkinson résident dans la plus grande rapidité de migration des bandes e, f, g. Dans le type classique, e et f apparaissent plus intensément que g, alors qu'on observe le contraire dans le type Atkinson. Ce type se rencontre d'ailleurs dans les deux formes $PGM_1$ et $PGM_{2-1}$. Par la suite les auteurs ont encore trouvé des phénotypes rares qu'ils écrivent $PGM_{3-1}$, $PGM_{3-2}$, $PGM_{4-1}$, $PGM_{4-2}$, $PGM_{5-2}$, $PGM_{6-1}$, $PGM_{6-2}$, $PGM_{7-1}$. Tous ces nouveaux phénotypes diffèrent par la vitesse de migration et l'intensité des sous-fractions enzymatiques.

Dans la population anglaise, la fréquence des gènes $PGM_1^1$ et $PGM_1^2$ est respectivement de 76 p.cent et 24 p.cent. LIE-INJO (26) dans une étude effectuée à l'Université de San Francisco, observe une fréquence analogue parmi les sujets dits Caucasiens, alors que chez les Noirs cette répartition est de 80 p.cent pour $PGM_1^1$ et 20 p.cent pour $PGM_1^2$. La variante trouvée chez les Noirs d'Amérique est vraisemblablement la même que le type Atkinson décrit par HOPKINSON et HARRIS et rencontrée chez 1 personne sur 2000 en Grande-Bretagne. Ces mêmes auteurs, ainsi que MOURANT et TILLS (27) lors d'une étude ultérieure, ont rapporté la fréquence de ces gènes parmi sept groupes ethniques différents d'Angleterre, de la Méditerranée orientale et d'Afrique, et que nous rapportons dans le tableau III.

La fréquence du gène $PGM_1^1$ se situe donc entre 75,8 p.cent et 79,2 p.cent parmi la population anglaise et africaine, contre 67,4 p.cent et 69,8 p.cent chez les populations méditerranéennes y compris les Juifs d'Irak. Quant aux Islandais, la répartition de 82,2 p.cent est la plus élevée jamais observée,

alors que celle des Juifs Habbanites vivant en Israël et n'atteignant pas 45 p.cent, est la plus faible qu'on n'ait jamais rencontrée. Enfin LIE-INJO (28), étudiant des populations chinoises de San Francisco, Kuala Lumpur et d'Indonésie, rapporte des fréquences respectives des gènes $PGM_1^1$ et $PGM_1^2$ de 75,7 p. cent et 24,3 p.cent. Il trouve même une quantité bien moindre, inférieure à 1 p.cent pour les gènes $PGM_6^1$ et $PGM_7^1$. Ces gènes seraient transmis comme un caractère héréditaire dominant.

Tableau III

Fréquence des gènes PGM (d'après HOPKINSON et HARRIS).

| Groupes ethniques | Gène $PGM_1^1$ | Gène $PGM_1^2$ |
|---|---|---|
| | (en p.cent) | |
| Anglais | 76,4 | 23,5 |
| Grecs | 69,3 | 30,7 |
| Juifs d'Irak | 67,4 | 32,6 |
| Cypriotes Turcs | 69,8 | 30,0 |
| Noirs : | | |
| - vivant en Angleterre | 78,6 | 21,4 |
| - Yoruba (Nigéria) | 75,8 | 23,9 |
| - Bantous (S.Africa) | 79,2 | 20,2 |
| Islandais | 81,8 | 18,2 |
| Habbanites | 43,0 | 57,0 |

## Chapitre V

## GLUCOSE-PHOSPHATE-ISOMÉRASE

L'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire associée au déficit en glucose-phosphate-isomérase a été rapportée pour la première fois il y a quelques mois seulement par BAUGHAN, VALENTINE, PAGLIA et coll. (29) chez un garçon de 16 ans, né de parents français et irlandais. Un second cas vient d'être étudié par le Dr.PHILLIP HOLLAND (30) à l'Université de Kentucky chez trois garçons issus d'une même fraterie de sept enfants. Ils présentaient tous une anémie hémolytique grave de type homozygote, mais les résultats n'ont pas encore été publiés. Les auteurs ne relevaient pas de consanguinité dans la famille. A la naissance, le jeune enfant présentait déjà les stigmates d'une hémolyse avec une réticulocytose élevée et une augmentation de la bilirubine directe et indirecte ainsi que du stercobilinogène fécal. En 1957 cette hémolyse fut attribuée à une anomalie intrinsèque du globule rouge. En effet, l'injection au sujet d'hématies normales marquées au $Cr_{51}$ avaient une demi -vie de 30 jours, alors que les hématies du malade n'avaient qu'une demi-vie de 4,5jours. Devant la persistance de l'hémolyse et l'importante splénomégalie, il fut pratiqué une splénectomie à l'âge de 9 mois. A part un épisode de gastro-entérite, on ne releva pas d'anomalie clinique sérieuse et le traitement ne comporta que des transfusions pratiquées périodiquement. Malgré la splénectomie, le sujet présenta toujours un syndrome hémolytique. L'anémie était du type hypochrome macrocytaire avec très forte réticulocytose, atteignant 24 à 37 p.cent. L'image sanguine montrait une anisopoïkilocytose avec polychromatophilie, des corps de Jolly, des hématies basophiles, quelques cellules-cibles, ainsi que des hématies nucléées. On relevait en outre quelques rares sphérocytes. La résistance osmotique était normale. L'auto-hémolyse sensiblement augmentée, était partiellement corrigée par l'addition de glucose ou d'inosine. Ce déficit pourrait donc être classé dans le type I de Selwyn et Dacie. La détermination des enzymes du globule rouge donnait des valeurs normales, parfois même augmentées en rapport avec la réticulocytose. Seul le taux de la glucose-phosphate-isomérase était très abaissé. Déterminé en présence d'une réticulocytose de 28 p.cent, les auteurs trouvaient des valeurs à 19 p.cent de la normale chez leur malade et 50 p. cent de la normale chez le père, la mère et le frère ainsi que chez quatre autres membres de la famille. Le test de réduction de la methémoglobine était normal, voire même légèrement augmenté en présence de bleu de méthylène. Le test de

stabilité du glutathion n'était pas perturbé et la teneur en ATP et en ADP du globule était normale quant à l'étude cinétique de l'enzyme ainsi que l'électrophorèse, les résultats ne sont pas encore connus.

L'investigation de cette anomalie métabolique en est qu'à ses débuts et la cause exacte de l'hémolyse est inconnue. Les études familiales ont montré qu'il s'agissait simplement d'une tare à transmission auto-somale récessive, les sujets hétérozygotes étant asymptomatiques, alors que les sujets homozygotes étaient atteints d'un syndrome hémolytique sévère, nécessitant des transfusions.

## Chapitre VI

## TRIOSE-PHOSPHATE-ISOMÉRASE

Ce déficit a été décrit en 1965 par SCHNEIDER,VALENTINE et coll. (31) chez un enfant atteint d'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire. La transmission de la tare s'effectuerait comme un caractère auto-somal récessif.

L'enfant était une fille de 13 mois, née en Louisiane de parents consanguins d'origine double, française et noire. Un autre enfant était mort à six jours, d'anémie hémolytique. Une soeur de la mère ayant fait elle aussi un mariage consanguin avait perdu deux enfants, d'anémie hémolytique.

Cliniquement, l'anémie avait été remarquée dès les premières semaines de la vie. Dans les mois qui suivirent, l'enfant avait présenté plusieurs épisodes infectieux et l'anémie hémolytique était restée assez stable. La rate était palpable. Sur le plan hématologique le nombre des globules rouges était de l'ordre de 3 000 000 et on relevait la présence de quelques macrocytes, de quelques cellules-cibles et de rares sphérocytes. La réticulocytose de 33 p.cent à cinq semaines était de 13 p.cent à 13 mois. L'auto-hémolyse était nettement augmentée mais corrigée par le glucose, l'adénosine et l'ATP.

Le déficit en triose-phosphate-isomérase intéressait les globules rouges et les globules blancs. Dans les premiers, l'activité était de l'ordre de 7 p.cent de la normale. Parmi vingt deux membres de la famille qui ont été explorés, les parents, un frère et cinq autres membres de la famille avaient des taux d'activité de l'ordre de 50 p.cent de la normale.

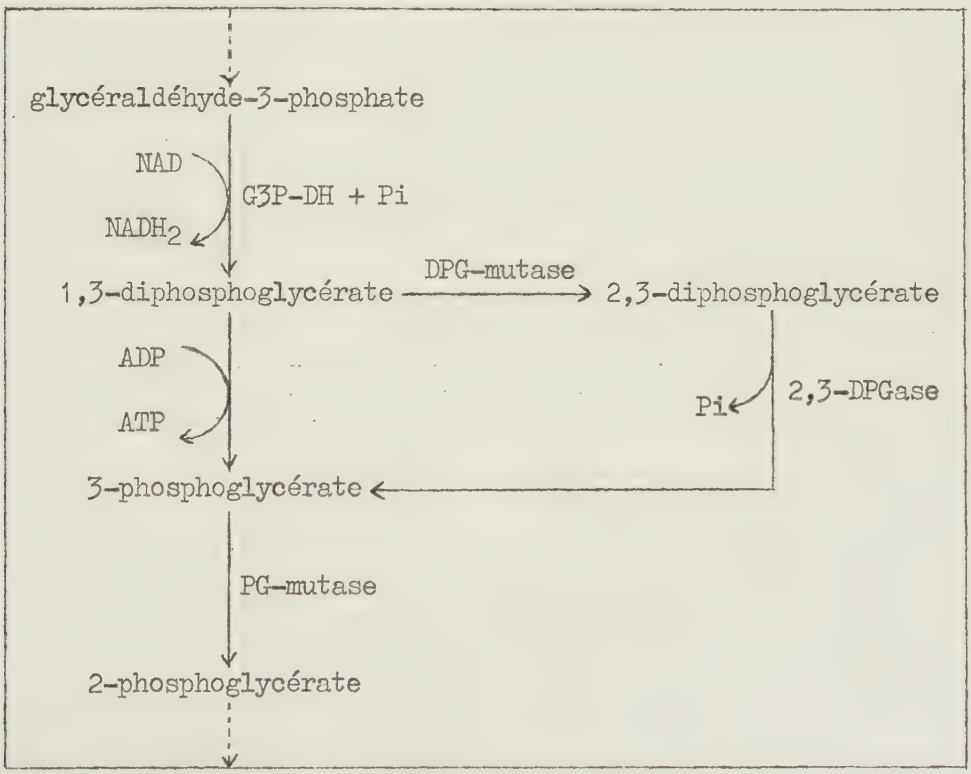
Ces mêmes auteurs (32) ont rapporté ultérieurement des études biochimiques plus complètes. Ainsi la glycolyse in vitro et la production de lactate ont été trouvées augmentées. La stimulation du shunt des pentoses par le bleu de méthylène est moins marquée dans les hématies du malade que dans celles des témoins. La triose-phosphate-isomérase transforme réversiblement l'un en l'autre les deux trioses-phosphates nés de la scission enzymatique du fructose-1,6-diphosphate par la fructose-1,6-diphosphoaldolase. Normalement l'isomérisation se fait dans le sens de la transformation de la dihydroxyacétone-phosphate en glycéraldéhyde-phosphate. L'accumulation de dihydroxyacétone-phosphate est susceptible de léser les cellules et serait peut-être la cause des troubles neurologiques observés. Le blocage de la triose-phosphate-isomérase a pour conséquence un déficit de 50 p.cent de la dégradation anaérobie du glucose, puisque seul l'un des deux trioses-phosphates

est utilisé. Ce déficit entraîne celui de la régénération de l'ATP et du $NADH_2$. Une voie de compensation probable est réalisée par le shunt des pentoses qui rejoint la voie d'Embden-Meyerhoff au niveau du fructose-6-phosphate d'une part et surtout du glycéraldéhyde-3-phosphate d'autre part, c'est-à-dire un métabolite situé au-delà du blocage que représente le déficit en triose-phosphate-isomérase.

## Chapitre VII

## 2,3-DIPHOSPHOGLYCÉROMUTASE

Le déficit en 2,3-diphosphoglycéromutase est difficile à affirmer. En effet il s'agit de conclusions basées sur les dosages des substrats et non de l'enzyme. Cet enzyme fut mis en évidence pour la première fois en 1950 par RAPOPORT et LUEBERING (3) qui lui donnèrent une signification particulière dans le métabolisme du globule rouge. Il permet en effet la transformation du 1,3-diphosphoglycérate en 2,3-diphosphoglycérate. Ce métabolite s'accumule à un taux élevé, puisqu'il représente plus de 90 p.cent des esters phosphoriques. Il constitue donc une réserve glucidique et énergétique non négligeable, car s'il y a déplétion glucidique érythrocytaire, il peut être déphosphorylé en 3-phosphoglycérate et rejoindre la voie principale selon un cycle auquel ces auteurs ont donné leur nom :




G3P-DH : glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase.
2,3-DPGase : 2,3-diphosphoglycérate-2-phosphohydrolase.
DPG-mutase : 2,3-diphosphoglycéromutase.
PG-mutase : phosphoglycérate-mutase.

Fig. 8 - Schéma du cycle de RAPOPORT - LUEBERING.

La plupart des observations rapportées sont basées sur la diminution du taux en 2,3-diphosphoglycérate. SCHRÖTER et HEYDEN (33) ont récemment décrit une technique de dosage de la 2,3-diphosphoglycéromutase. Cette méthode est complexe, car elle utilise une chaîne de réactions enzymatiques qui du fructose-1,6-diphosphate aboutit au lactate. ROSE (34) a apporté dernièrement des connaissances nouvelles quant aux propriétés physico-chimiques de l'enzyme et plus particulièrement en ce qui concerne les constantes de Michaelis vis-à-vis du 1,3-diphosphoglycérate et du 3-phosphoglycérate. Il montre en outre que le 2,3-diphosphoglycérate est un inhibiteur compétitif vis-à-vis du 1,3-diphosphoglycérate. La diphosphoglycéromutase est inhibée par les groupements sulfhydriles et à l'état purifié, elle nécessite la présence de mercaptoéthanol pour un optimum d'activité.

Sur le plan clinique il y aurait actuellement sept cas connus de ce type avec transmission héréditaire dominante. PRANKERD (35) a décrit le déficit chez un enfant atteint d'une anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire. Dans les hématies la glycolyse totale était diminuée, les taux d'ATP et de 2,3-diphosphoglycérate étaient bas, alors que celui du fructose-1,6-diphosphate était élevé. LÖHR et WALLER (36) ont décrit d'autres cas analogues où l'activité enzymatique serait comprise entre 12 et 39 p.cent de la normale. Enfin, ALAGILLE et coll. (37) rapportent le cas d'un nourrisson chez qui était notée en outre une grande instabilité du glutathion réduit à l'acétylphénylhydrazine, une diminution de la glycolyse totale et de l'ATP. La splénectomie avait entraîné une amélioration nette.

SCHRÖTER (38) a étudié un cas d'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire chez un nouveau-né. Le sang de l'enfant n'a pas été employé, car du fait de la sévérité de l'hémolyse, les transfusions répétées étaient indispensables. Par contre, chez les parents qui étaient consanguins et plusieurs autres membres de la famille, le taux de 2,3-diphosphoglycérate était à 50 p.cent de la normale et le taux de 2,3-diphosphoglycéromutase variait de 55 à 60 p.cent de la normale chez les mêmes sujets en l'absence de toute anomalie clinique et hématologique. L'auteur conclut à la présence d'une tare récessive, vis-à-vis de laquelle les parents étaient hétérozygotes et l'enfant homozygote.

L'authenticité du déficit en 2,3-diphosphoglycéromutase paraît probable. Cependant il faut rappeler que dans le déficit en triose-phosphate-isomérase, existe un abaissement du taux du 2,3-diphosphoglycérate et on ne peut affirmer un déficit en cet enzyme sur le seul critère de l'abaissement de son substrat.

## Chapitre VIII

## PYRUVATE-KINASE

Le déficit en pyruvate-kinase est de par sa fréquence la deuxième érythroenzymopathie importante. Décrite en 1962 par TANAKA et VALENTINE (39), il s'agit d'un déficit transmis comme une tare autosomique récessive. Aujourd'hui plus de soixante cas ont été décrits dans la littérature.

Rappel clinique et biologique.

Cette affection est caractérisée par un polymorphisme clinique. Le début des symptômes remonte souvent à la première enfance et l'ictère hémolytique néonatal est signalé dans près de la moitié des cas. A cet âge, l'hémolyse peut être très sévère pouvant conduire à faire pratiquer une splénectomie d'urgence. Chez d'autres malades, l'hyperhémolyse n'est révélée que plus tard à l'adolescence ou à l'âge adulte. Le tableau est alors celui d'une anémie hémolytique de sévérité modérée et dépourvue des grandes poussées que l'on peut rencontrer lors des déficits en G6PD. L'anémie est le plus souvent assez bien tolérée, autorisant une vie pratiquement normale. Il existe cependant des exceptions comme le prouve un malade de TANAKA qui reçut plus de 150 transfusions à 33 ans. MALLARME (40) et OSKI (41) signalent des anomalies osseuses : crâne volumineux, saillies basses frontales, aplatissement de la base du nez. CARTIER et coll. (42) décrivent le cas d'une lithiase vésiculaire due à la persistance de l'hémolyse et à laquelle fut remédiée par une cholécystectomie.

Les manifestations hématologiques sont celles d'une hyperhémolyse. Certains malades ne sont pratiquement pas anémiques : les chiffres des globules rouges sont habituellement compris entre deux et quatre millions; on peut rencontrer assez souvent une macrocytose, une ovalocytose ou une légère sphérocytose. NATHAN, OSKI et coll. (43) relèvent même dans une de leurs observations la présence d'hématies crénelées ressemblant à l'acanthocytose. La résistance globulaire est en général normale. La plupart des cas, et c'est là une particularité importante à signaler, peuvent être classés dans le type II de SELWYN et DACIE où l'auto-hémolyse est très augmentée, non corrigée par le glucose, mais corrigée par l'ATP. La réticulocytose est en général très élevée et peut atteindre 30 à 50 p.cent. L'érythroblastose médullaire est naturellement augmentée, de même que le taux de bilirubine non conjuguée et de stercobilinogène fécal. La durée de vie des hématies peut être extraordi-

nairement raccourcie : ainsi dans l'observation d'OSKI la demi-vie des hématies marquées au $Cr_{51}$ était de 0,7 jour, 2,9 jours et 2 jours pour une durée de vie normale de 28 jours. Cependant dans certains cas chez l'adulte, la survie des hématies est peu différente de la normale.

En ce qui concerne la fréquence de la maladie, il faut dire que les deux sexes sont également touchés. La consanguinité est retrouvée dans certaines observations. Le dépistage des hétérozygotes est possible. On retrouve chez ces sujets des taux d'enzyme voisins de 50 p.cent de la normale, compris entre 32 et 80 p.cent. Mais on observe une très grande variabilité de l'activité de l'enzyme : il existe un chevauchement important entre le taux des homozygotes et ceux des hétérozygotes d'une part, de ces derniers et des sujets normaux de l'autre, et il est souvent difficile de classer le sujet examiné dans tel ou tel groupe. Certains hétérozygotes n'ayant aucune manifestation clinique, ni hématologique apparente ont des taux égaux ou plus bas que ceux de l'homozygote correspondant. Les hétérozygotes sont cliniquement normaux. Dans la majorité des cas ils le sont aussi sur le plan hématologique, mais peut-être pas toujours. Ainsi dans le cadre d'une étude systématique de malades atteints d'hyperbilirubinémie non conjuguée, BOIVIN et coll. (44) observent deux malades ayant une diminution modérée de la durée de vie des hématies et un taux de pyruvate-kinase de type hétérozygote. L'authenticité du déficit a pu être confirmée par la découverte chez la fille du propositus d'un taux de pyruvate-kinase d'hétérozygote. Il paraît donc comme vraisemblable que certains hétérozygotes ne sont pas hématologiquement normaux et seule une étude systématique de la durée de vie des hématies permettrait de résoudre le problème.

Le pronostic du déficit en pyruvate-kinase ne semble pas très mauvais. Ce n'est guère que dans les toutes premières années de la vie que le pronostic vital est en jeu. Plus tard l'hémolyse se stabilise.

Caractères physico-chimiques.

L'étude des propriétés des pyruvates-kinases des sujets déficitaires n'en est encore qu'à ses débuts. La difficulté majeure rencontrée dans leur étude est due à l'extrême labilité de l'enzyme à la température, à certaines forces ioniques, à l'absence d'ions potassium, etc... Or l'étude des caractéristiques de l'enzyme dans les cas pathologiques est indispensable pour déterminer la signification génétique du déficit enzymatique. L'hypothèse d'une hétérogénéité des pyruvates-kinases anormales analogue à celle des déficits en G6PD était

évidemment séduisante : ou bien les pyruvates-kinases des sujets déficients ont toutes propriétés identiques à celles des enzymes normaux et on parlera de mutation intéressant les gènes de contrôle, ou bien les enzymes sont anormaux et la mutation intéressera le ou les gènes de structure, les deux variétés pouvant d'ailleurs exister. Les études des propriétés électrophorétiques et surtout des caractéristiques cinétiques ont fourni des résultats si variables qu'ils ne permettent aucune conclusion. En particulier les constantes de Michaëlis (Km) sont selon les cas, abaissées, normales ou augmentées.

Dans une récente étude, BIGLEY et coll. (45) rapportent les caractères essentiels des pyruvates-kinases de l'homme. Ils mettent en évidence trois isoenzymes différents : PK I, PK II, PK III, dont ils étudient les propriétés chromatographiques, électrophorétiques, leur solubilité dans le sulfate d'ammonium, leur comportement antigénique et cinétique. Leurs particularités sont résumées dans le tableau IV.

Tableau IV

Répartition de la pyruvate-kinase dans les tissus chez l'homme.

| | Isozyme I | Isozyme II | Isozyme III |
|---|---|---|---|
| Tissus | foie, hématies | reins | foie, reins, muscles cerveau, leucocytes |
| Précipitation par $SO_4(NH_4)_2$ | 30-38 p.cent | 38-45 p.cent | 45-60 p.cent |
| Chromatographie sur DEAE-cellulose | 0,04-0,12 M | front | front |
| Electrophorèse pH 8,6 | rapide | intermédiaire | lent |
| Inactivation par sérum PK anti-globules rouges | 81-99 p.cent | 42-54 p.cent | 0-7 p.cent |

Il faut remarquer que les types I et III ne donnent qu'une seule bande à l'électrophorèse, le type I des hématies étant la forme rapide migrant le plus vers l'anode. Lors de la chromatographie, le type I est élué de la colonne où le gradient de KCl est de 0,04 à 0,12 M. Grâce à la filtration sur Séphadex G 200, ces auteurs ont montré que les isozymes PK I et PK III avaient le même poids moléculaire. Ces deux enzymes sont inhibés, bien qu'à concentration différente, par

l'octanoate et tous deux sont activés par les ions $K^+$. STEINMETZ et DEAL (46) prétendent que la molécule de pyruvate-kinase est composée de deux "protomères" dont chacun peut se dissocier en deux chaînes polypeptidiques semblables. C'est ainsi que l'on peut écrire PK I sous la forme $p_1p_1$, PK III sous la forme $p_3p_3$ et PK II sous la forme $p_1p_3$. Environ la moitié de l'activité de PK II est inactivée par l'antisérum anti-PK I. L'anticorps va détruire $p_1$ tout en laissant $p_3$ indemne. PK II apparaît donc comme une forme intermédiaire entre PK I et PK III.

Comme on peut donc le voir, les résultats concernant l'étude quantitative de l'enzyme n'a donné que des résultats fragmentaires. Aussi ces derniers mois les auteurs et en particulier WOLFF et ZUELZER (47), SACHS (48), BOIVIN (49), PAGLIA (50) ont tenté de pénétrer les mécanismes des gènes de contrôle. Les travaux ont donc été orientés dans le sens de l'aspect qualitatif de la pyruvate-kinase. L'étude la plus complète est certainement due à CARTIER et coll. (42) qui ont déterminé dans les moindres détails les modifications glycolytiques du globule rouge et les caractères cinétiques de la pyruvate-kinase à propos de deux cas d'anémie hémolytique congénitale par déficit en cet enzyme. Plusieurs travaux ont étudié la constante de Michaëlis de la pyruvate-kinase vis-à-vis du phosphoénol-pyruvate, mais les résultats sont extrêmement discordants. Ceci est dû au fait que la constante de Michaëlis est déduite d'une représentation graphique de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat. La représentation la plus utilisée est celle de Lineweaver et Burk. Mais cette constante qui reflète l'affinité de l'enzyme pour son substrat se détermine sur une préparation purifiée de l'enzyme et n'a de valeur absolue que dans les conditions expérimentales déterminées à savoir : conditions de pH, de concentration en $K^+$, en $Mg^{++}$, en ADP. Cette purification de l'enzyme suppose précisément qu'elle n'en modifie pas les propriétés, mais BOIVIN (49) signalait récemment des différences importantes de la Km du phosphoénol-pyruvate, selon l'origine de la DEAE-cellulose utilisée. Cette difficulté technique reflète d'une façon probante l'extrême labilité de l'enzyme. Les études cinétiques de l'enzyme partiellement purifié ont montré qu'il existe deux formes de pyruvate-kinase dans le globule rouge, qu'il soit normal ou déficient : une pyruvate-kinase B qui présente une cinétique hyperbolique, une Km apparente vis-à-vis du phosphoénol-pyruvate de $3,6 \cdot 10^{-5}$ M, une insensibilité au fructose-diphosphate et une pyruvate-kinase A qui présente une cinétique allostérique et une Km apparente vis-à-vis du phosphoénol-pyruvate de $19,3 \cdot 10^{-5}$ M. Cette dernière forme est activée par de très basses concentrations de fructose-diphosphate. La pyruvate-kinase A activée par le fructose-diphosphate retrouve la même Km

que la pyruvate-kinase B. L'ADP inhibe à des concentrations supérieures à $30 \cdot 10^{-5}$ M, inhibition levée par le fructose-diphosphate. Enfin, l'ATP est inhibiteur aux concentrations intracellulaires.

Conséquences métaboliques.

Des travaux publiés à ce jour, se dégagent des résultats que nous retrouvons assez constamment dans la description des observations. La difficulté majeure dans l'étude de cet enzyme vient du fait de la présence dans le sang des malades d'un taux très important de réticulocytes. Les érythrocytes déficients en pyruvate-kinase montrent donc un taux d'ATP nettement abaissé. La glycolyse totale est diminuée, ce qui paraît être la conséquence de la non régénération de l'ATP.En outre, le blocage de la glycolyse au niveau de la pyruvate-kinase, entraîne une accumulation des métabolites du glucose qui sont produits en amont de la réaction pyruvate-kinasique et en particulier celle du phosphoénol-pyruvate, celle du glucose-6-phosphate qui inhibe l'hexokinase, du 3-phosphoglycérate qui inhibe la diphosphoglycéromutase, expliquant peut-être ainsi l'élévation du 2,3-diphosphoglycérate. D'autres modifications ont été notées : diminution du NAD et du $NADH_2$, augmentation de l'AMP. Le déficit en ATP entraînerait des troubles fonctionnels de la membrane cellulaire, peut-être par l'intermédiaire du système de l'ATPase $Na^+$ et $K^+$ dépendante. BOWLER et PRANKERD (35) observent en effet un taux de $K^+$ cellulaire abaissé et une augmentation du taux de $Na^+$. Cependant certains auteurs ont trouvé des taux normaux d'ATP au cours des déficits en pyruvate-kinase et l'accumulation de métabolites tels que le phosphoénol-pyruvate et le 2,3-diphosphoglycérate pourrait être indirectement responsable de la destruction cellulaire.

## Chapitre IX

## LACTICO-DÉSHYDROGÉNASE

Cet enzyme, terminant la dégradation anaérobie du glucose en transformant l'acide pyruvique en acide lactique, ne présente que peu d'intérêt dans la pathologie enzymatique du globule rouge : en effet, on n'a pu trouver de déficit et il n'a pu être mis en cause dans aucun syndrome hémolytique. Cependant la lactico-déshydrogénase (LDH) érythrocytaire n'est pas sans importance, puisqu'elle joue un rôle primordial dans les phénomènes de vieillissement du globule rouge et c'est l'étude de ces isozymes qui a permis d'y apporter quelque éclaircissement.

Les isozymes de la LDH sont de beaucoup les mieux connus, surtout depuis les travaux de MARKERT (51) et de CAHN (52) qui en ont déterminé la structure quaternaire. A l'électrophorèse de zone à pH 8,5 , ils séparent cinq bandes isozymiques formées par l'assemblage au hasard de quatre subunités de deux types, de poids moléculaire identique, mais de charge différente. Ces cinq bandes sont schématisées dans la figure 9.

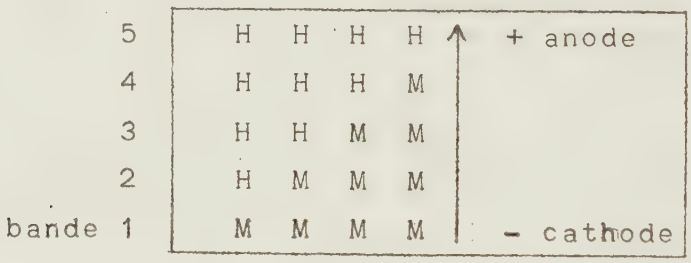



Fig. 9 - Isozymes de la LDH, selon la nomenclature américaine.

La nomemclature de ces isozymes est relativement complexe,puisque les auteurs européens utilisent une numérotation inverse de celles des auteurs américains. Nous adopterons ici celle des auteurs américains.

On voit donc que l'électrophorèse sépare deux tétramères purs et trois hybrides. Le type M est caractéristique du muscle et du foie, le type H du coeur. La répartition des isozymes varie selon l'espèce et surtout l'organe. L'étude des isozymes se fait donc selon les processus habituels,c'est-à-dire électrophorèse en gel d'amidon ou en gélose, chromatographie, action de certains effecteurs, étude de la thermostabilité,

action sur un substrat secondaire : l'$\alpha$ cétobutyrate, et Constante de Michaëlis. Il a ainsi été démontré que les hématies possèdent essentiellement le type H. En effet, le repérage des bandes s'effectue par une coloration très sensible et très spécifique, puisqu'elle permet de détecter l'activité enzymatique elle-même. Une fois la séparation électrophorétique achevée, on incube le gel dans un tampon en présence de lactate et de NAD. En présence de LDH le lactate est oxydé en pyruvate, tandis que le NAD est réduit en $NADH_2$. Un transporteur d'électrons, le phénazine-méthosulfate transporte l'hydrogène du $NADH_2$ sur le sel de tétrazolium qui se transforme en formazan bleu-violet. Grâce à cette méthode, il est donc facile de mettre en évidence les différentes bandes obtenues. Ainsi on s'aperçoit que le tétramère $M_4$ est très peu abondant dans les globules rouges normaux, si bien qu'il est peu ou pas visible. Cependant on le rencontre chez les sujets présentant une réticulocytose intense, ainsi que dans les érythroblastes. De même les combinaisons $M_3H_1$, $M_2H_2$, $M_1H_3$ sont surtout visibles dans les hématies jeunes. SCHAPIRA (53) et STARKWEATHER (54) en séparant par gradient de densité les globules mûrs jeunes et âgés obtiennent les tracés suivants (figure 10) :

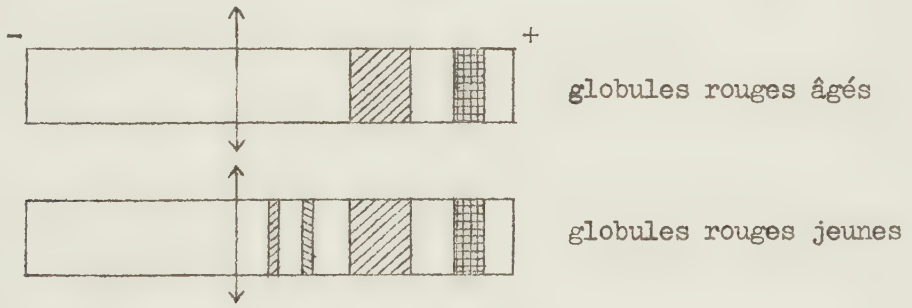



Fig. 10 - Isozymes de la LDH dans le globule rouge (d'après SCHAPIRA et ROSA).

On voit donc quatre isozymes dans les globules rouges jeunes et deux dans les globules rouges âgés. STARKWEATHER a mesuré le pourcentage de chaque fraction dans une population érythrocytaire normale. Il trouve constamment pour la fraction 1, 36 p. cent, fraction 2, 44 p.cent, fraction 3, 14 p.cent, fraction 4, 3 à 4 p.cent, fraction 5, 2 p.cent. Il semble donc que l'évaluation du pourcentage des différentes fractions puisse permettre d'estimer l'âge d'une population érythrocytaire. SCHAPIRA essaie d'expliquer ce phénomène en formulant plusieurs hypothèses:

- la synthèse des subunités de type M cesse au moment de la maturité de l'érythrocyte, alors que celle des subunités H continue;

- la durée de vie des teux types de subunités est différente;

- il se produit une inactivation des isozymes de type M.

GOODFRIEND et KAPLAN (55) ont récemment apporté la preuve de la répression par l'oxygène de la synthèse des subunités M. On pourrait imaginer un inducteur de la synthèse de H et un répresseur de la synthèse de M qui soit fonction de l'âge de la cellule. NANCE et coll. (56) ont étudié quatre membres d'une famille brésilienne qui présentait une mutation du type M. En effet, après électrophorèse, les globules rouges montraient deux bandes au niveau de la bande 2 et deux bandes à la place de la bande 3. Quant à BOYER (57), il rapporte la preuve de la mutation d'un allèle gouvernant la synthèse du type H. Le sujet hétérozygote possède des subunités H normales et des subunités $\beta$ mutées de charge légèrement différente (figure 11) :

| | Normal | Variant |
|---|---|---|
| 1 | $H_4$ | $H_4$<br>$H_3\beta_1$<br>$H_2\beta_2$<br>$H_1\beta_3$<br>$H_4$ |
| 2 | $H_3M_1$ | $H_3M_1$<br>$H_2\beta_1M_1$<br>$H_1\beta_2M_1$<br>$H_3M_1$ |
| 3 | $H_2M_2$ | $H_2M_2$<br>$H_1\beta_1M_2$<br>$H_2M_2$ |

Fig. 11 - Isozymes de la LDH des globules rouges du mutant décrit par BOYER et coll.

KRAUS et NEELY (58) rapportent le cas d'une autre mutation portant sur M , H étant normal. La mutation semble être transmise selon le mode dominant.

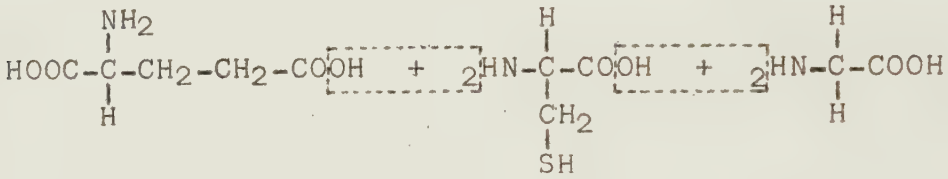
STARKWEATHER et coll. (54) ont examiné les isozymes de la LDH au cours des différentes affections hématologiques. Ils ont surtout observé des variations du taux de l'isozyme 5 (isozyme 1 dans la nomenclature européenne). Cet isozyme est augmenté dans toutes les circonstances où l'érythropoïèse est très active et la réticulocytose élevée : anémies hémolytiques, thalassémies, drépanocytose. Déjà très faible, elle diminue par contre encore en cas d'anémies hypoplastiques. Au cours des affections malignes, l'étude de la LDH fournit des indications intéressantes sur l'érythropoïèse. Le taux de la fraction 5 au cours de ces maladies suit des variations qui sont le reflet de l'activité érythropoïétique. Ainsi celle-ci augmente au cours des traitements de la maladie de Hodgkin au moment où l'anémie se répare. Il en est de même au cours des myélomes multiples, des leucoses myéloïdes chroniques et de la maladie de Di Guglielmo.

## Chapitre X

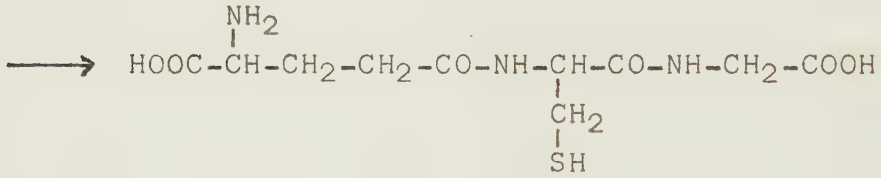
## ANOMALIES PORTANT SUR LE GLUTATHION

Généralités.

Le glutathion est un tripeptide formé de l'acide L-glutamique, de la L-cystéine et de la glycine.



ac. glutamique cystéine glycocolle



Le rôle qu'il joue dans l'organisme est très particulier et il intervient dans de nombreux métabolismes. La cystéine, grâce à son groupement thiol, permet l'oxydation du glutathion par union de deux de ses molécules et formation d'un pont disulfure, selon la réaction réversible

C'est donc un acide aminé soufré qui confère les propriétés particulières à ce peptide. En effet, la cystéine dont le groupement thiol s'oxyde plus facilement que la plupart des constituants cellulaires, les protège par effet compétitif d'une oxydation. Aussi, lorsque le taux de glutathion intracellulaire vient à baisser, ces substances se trouvent directement exposées à tout excès d'agent oxydant. Le cas le plus typique est celui de l'hémoglobine dont la dégradation oxydative entraîne l'apparition d'une hémolyse. Le potentiel du système GSH/GSSG est bas : -0,13 v à pH 7, de sorte que le GSH est facilement oxydé. En effet les groupes glutamyl et glycyl augmentent la mobilité de l'hydrogène du groupe SH.

L'efficacité de cette protection contre l'oxydation est augmentée du fait que dans les cellules l'équilibre GSH - GSSG tend à la production de GSH qui y est la forme la plus abondante. Ainsi dans les hématies, la forme réduite serait environ vingt fois plus représentée que la forme oxydée. Pour maintenir ce déséquilibre, le globule rouge dépense de l'énergie presqu'essentiellement sous la forme de $NADPH_2$ qu'il obtient en dégradant du glucose par la voie aérobie des pentoses.

Rôle biochimique.

1°) Biosynthèse :

On a longtemps considéré que la synthèse du glutathion était uniquement hépatique. Mais l'emploi d'acides aminés marqués a permis de montrer que les globules rouges même adultes, disposaient de systèmes enzymatiques assez complexes pour incorporer de la glycine ou de l'acide glutamique dans des molécules de glutathion.

Cette synthèse comporte deux principales étapes, à savoir :

- la formation d'un dipeptide glutamyl-cystéine sous la dépendance d'une glutamyl-cystéine-synthétase

ac. L-glutamique + L-cystéine + ATP ⟶ γ-L-glutamyl-L-cystéine + ADP + $PO_4H_3$

- puis celle du tripeptide par fixation de glycine sur le dipeptide sous la dépendance de la glutathion-synthétase

γ-L-glutamyl-cystéine + glycocolle + ATP ⟶ GSH + ADP + $PO_4H_3$

2°) Biologie :

- association glutathion-protéines : dans les hématies, le glutathion peut être libre, mais une partie semble liée à différentes protéines du contenu cellulaire, telles l'hémoglobine, ou même de la membrane cellulaire. La fixation se ferait au niveau des groupements SH de ces protéines.

Protéine-SH + GS-SG ⇌ Protéine-S-SG + GSH

- glutathion et enzymes à groupements thiol : le glutathion protège les groupes SH de nombreux enzymes : déshydrogénases, kinases, phosphatases. Aussi lorsque le rapport

GSH/GSSG qui est normalement de vingt dans les érythrocytes, chute en dessous de dix, de nombreux enzymes à SH sont inactivés. C'est le cas de l'hexokinase, de la pyrophosphatase, de la G6PD ou de la glycéraldéhyde-phosphate-déshydrogénase.

- glutathion et membranes cellulaires : le glutathion joue un rôle important dans la constitution et le fonctionnement des membranes cellulaires. JACOB et JANDL (59) considèrent que les SH intracellulaires sont moins importants que ceux des membranes cellulaires. Il faut remarquer que l'inhibition du glutathion réduit par la N-éthylmaléimide a les mêmes effets que l'action d'un inhibiteur de perméabilité cellulaire ou que la fixation d'anticorps sur les cellules, à savoir :

- blocage de la "pompe à sodium"
- augmentation de la séquestration splénique et hépatique des hématies
- puis hémolyse.

Pour ces auteurs, l'action hémolytique des agents d'oxydation serait due à des oxydations intracellulaires capables de se répercuter au niveau des membranes en détruisant leurs groupements SH. Dans d'autres cas, l'inhibition des SH de surface se ferait directement.

Enzymes agissant sur le glutathion.

1°) Glutathion-réductase :

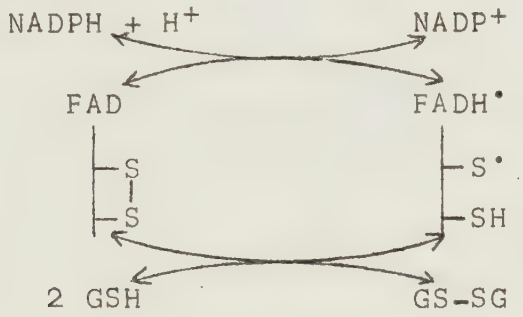
Classiquement considérée comme un enzyme double, elle catalyserait deux réactions irréversibles :

$$GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow 2\ GSH + NADP^+$$

$$GSSG + NADH + H^+ \longrightarrow 2\ GSH + NAD^+$$

On a donc distingué deux enzymes dits NAD spécifique et NADP spécifique. Ils sont parmi les plus stables des enzymes globulaires, mais ils n'agissent qu'en présence de SH libres actifs, de sorte qu'ils sont inhibés par les cations bivalents $Cu^{++}$, $Zn^{++}$, $Hg^{++}$. De même, l'héparine inhibe préférentiellement l'enzyme spécifique du NAD. Récemment, ICEN (60) est venu bouleverser ces notions. Il met en doute l'existence de deux glutathion-réductases, affirmant qu'un seul enzyme peu spécifique agirait indifféremment en présence de NADP ou de NAD. D'autre part, MASSEY et WILLIAMS (61) ont montré que cet enzyme aurait une structure flavoprotéique : chacune de ses

molécules comporterait deux FAD, de sorte que le mécanisme de son action serait le suivant :




2°) Glutathion-peroxydase :

Elle a été isolée des hématies assez récemment. On sait que c'est une protéine, que son activité dépend de la teneur en groupements SH du milieu et qu'elle catalyse spécifiquement la réaction

$$2\ GSH + H_2O_2 \rightleftharpoons GSSG + 2\ H_2O$$

ce qui lui permet de protéger les constituants cellulaires de l'action de $H_2O_2$ et des peroxydes. Dans les cellules $H_2O_2$ proviendrait notamment de la transformation de l'acide ascorbique en acide dihydroascorbique qui fournit 2 H et dont la combinaison à $O_2$ de l'oxyhémoglobine $HbO_2$ aboutit au peroxyde $H_2O_2$. WINTROBE et coll. (62) ont remarqué que le GSH seul protège assez mal l'hémoglobine humaine de l'oxydation due à la vitamine C, mais que l'addition de glutathion-peroxydase augmente considérablement l'efficacité du GSH. Ils en déduisent que la glutathion-peroxydase favorise l'oxydation préférentielle du GSH qui a alors lieu à la place de celle de l'hémoglobine.

Pathologie des enzymes du glutathion.

Il s'agit d'un groupe d'affections ayant en commun un tableau clinique d'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire, une sensibilité particulière à certains médicaments ou toxiques, un effondrement plus ou moins important du glutathion réduit érythrocytaire.

1°) Glutathion-réductase :

C'est en 1932 que MANN (63) mit en évidence pour la première fois l'existence de la glutathion-réductase, mais ce

n'est qu'en 1961 que CARSON et coll. (64) rapportèrent le cas d'un déficit en cet enzyme chez un sujet présentant un tableau clinique d'intolérance à la primaquine. Le taux de glutathion réduit était abaissé sans instabilité à l'acétylphénylhydrazine et la glutathion-réductase diminuée d'environ 50 p.cent. Depuis 1962, les auteurs allemands et en particulier BRITTINGER (65) et LÖHR (66) ont décrit plus d'une vingtaine de cas de ce déficit. On ne peut qu'être frappé par le polymorphisme clinique et biologique des observations publiées. Les cas de déficit partiel sont souvent associés à une anémie hémolytique non sphérocytaire, à une leucopénie ou une thrombopénie pouvant aller jusqu'à la pancytopénie. WALLER, LÖHR et coll. (67) rapportent dans une de leurs observations l'association à une oligophrénie et à des signes de désordres neurologiques graves du groupe de Babinski, accompagnés d'une perturbation de l'électroencéphalogramme avec signes pyramidaux et oligophrénie. Dans des études ultérieures, ces auteurs ont pu mettre en évidence un déficit partiel en glutathion-réductase, associé à la présence d'hémoglobine C et même de β thalassémie mineure. Dans une observation non publiée, ils ont relevé l'association à une leucose aiguë. Mais souvent dans les déficits partiels, les troubles hématologiques sont minimes et ils seront extériorisés par la prise de certains médicaments tels la chloroquine, la salicylazosulfapyridine, les nitrofurantoïnes, les sulfonamides, la phénylbutazone, la phénacétine, la dicoumarine, le chloramphénicol, etc..., tout comme lors des déficits en G6PD. L'activité glutathion-réductasique est abaissée de 50 p.cent environ. Ce serait une tare dominante autosomique. Mais l'enzyme présente en outre des anomalies qualitatives connues depuis les études de EIFLER et coll.(68). Ces études furent reprises ultérieurement par LÖHR et coll. (67). Les résultats sont résumés dans le tableau V.

Tableau V

Caractères biochimiques de la glutathion-réductase.

| | | EIFLER | LÖHR |
|---|---|---|---|
| pH optimum | | entre 6,1 et 6,4 | entre 6,4 et 6,8 |
| Km | GSSG | $2,5 \cdot 10^{-5}$ M | $6,4 \cdot 10^{-5}$ M |
| | NADH-NADPH | 1,3 à 1,7 $\cdot 10^{-5}$ M | $1,6 \cdot 10^{-5}$ M |

La différence entre les valeurs trouvées pour la Km vis-à-vis du glutathion oxydé est certainement due à la purification de

l'enzyme. En effet, EIFLER obtenait un enzyme purifié 330 fois, quant à LÖHR, il l'obtenait purifié 2000 fois. Ces auteurs signalent l'augmentation de la Constante de Michaëlis pour le glutathion oxydé et une anomalie du pH optimal, lors des déficits en glutathion-réductase.

Récemment BLUME et coll. (69) ont entrepris l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH 6,2. Ils séparent ainsi deux isozymes GR I et GR II (figure 12).

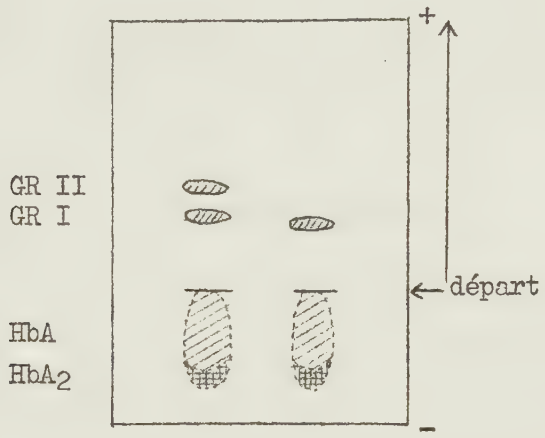



Fig. 12 - Tracé électrophorétique des isozymes de la glutathion-réductase.

Après élution des deux bandes dans un tampon triéthanolamine à pH 7,5 , ils déterminent leur activité respective : ils trouvent 65 p.cent pour GR I et 35 p.cent pour GR II. Dans certains cas de déficit partiel, ils retrouvèrent toute l'activité en position I .

2°) Glutathion-peroxydase :

Aucun déficit n'a été décrit à ce jour, mais récemment, NECHELES et coll. (70) ont découvert chez trois nouveaux-nés une diminution de 50 p.cent de l'activité glutathion-peroxydasique avec anémie hémolytique néonatale. Chez ces enfants la G6PD était normale, mais le test à l'acétylphénylhydrazine donnait un taux anormalement élevé de corpuscules de Heinz. Cette tare est transmise par un gène auto-somal. D'après GROSS et coll. (71) l'activité de l'enzyme est réduite chez les nouveaux-nés, ce qui expliquerait leur plus grande susceptibilité vis-à-vis des médications hémolytiques.

3°) Glutathion-synthétase :

Le déficit congénital est rare. Il est caractérisé par un taux de glutathion réduit bas. Le défaut porte sur la synthèse et non sur la stabilité. BOIVIN et GALLAND (72) ont montré que les hématies des malades n'incorporaient pas le glycocolle marqué dans le tripeptide. La synthèse s'arrête au dipeptide glutamylcystéine. Les sujets ont un taux de glutathion réduit d'environ 10 p.cent du taux normal. Il existe une anémie hémolytique bien compensée, mais aggravée par l'ingestion de primaquine et de fèves. In vitro l'incubation de globules rouges en présence d'acétylphénylhydrazine, provoque la formation de corps de Heinz. Il est important de remarquer que ces malades ne sont pas méthémoglobinémiques, et que la glycolyse, ainsi que la production d'ATP, sont normales.

## Chapitre XI

## LES MÉTHÉMOGLOBINES-RÉDUCTASES

Les méthémoglobines-réductases comme les glutathion-réductases sont au nombre de deux, dont les coenzymes sont le $NADH_2$ et le $NADPH_2$. Elles empêchent l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine. Leur action est liée à la glycolyse d'une part et à la présence de donneurs d'hydrogène d'autre part. Alors qu'on connaît de nombreux déficits en méthémoglobine-réductase à $NADH_2$, il n'a pas été possible à ce jour de mettre en évidence un déficit en méthémoglobine-réductase à $NADPH_2$.

MÉTHÉMOGLOBINE-RÉDUCTASE $NADH_2$ dépendante.

Cet enzyme est plus couramment désigné par diaphorase I. Mis en évidence en 1948 par GIBSON (73) et purifié plus tard par SCOTT (74), il s'agit d'une flavoprotéine capable de transférer les électrons sur différents substrats dont la méthémoglobine. Cet enzyme intervient normalement dans la réduction de la méthémoglobine qui se forme continuellement in vivo et dont il maintient le taux à un niveau inférieur à 1 p.cent. Ce rôle physiologique est démontré par l'existence d'une méthémoglobinémie importante chez les sujets qui en sont congénitalement dépourvus. Cette affection semble être connue de longue date, et il en existerait plus de 150 cas publiés à ce jour. Sa répartition géographique est très étendue. Si la plupart des cas connus sont de souche européenne (75, 76, 77), SCOTT (78, 79, 80) en a décrit plus de vingt cas en Alaska chez des Esquimaux et des Indiens. Les études de ces familles ont montré qu'il s'agissait d'une affection récessive autosomique (81, 82, 83) et qu'il faut bien distinguer des méthémoglobinémies par anomalie de l'hémoglobine à expression dominante. Cette affection se traduit cliniquement par une cyanose le plus souvent précoce et permanente des lèvres et des extrémités. Lorsque cette cyanose est intense, elle s'accompagne presque toujours de céphalées, de vertiges et de dyspnée. Le sang de ces sujets renferme 20 à 45 p.cent de méthémoglobine. La cyanose tend à s'atténuer avec l'âge.

Chez le nouveau-né dans les premiers jours de la vie, l'activité diaphorasique des globules rouges peut être significativement inférieure à la normale, se normalisant ensuite. Cette immaturité enzymatique alliée à la présence d'hémoglobine foetale plus oxydable, explique certainement bon nombre de cyanoses péri-natales passagères dont on ne retrouve pas

la cause. On connaît une vingtaine de cas de méthémoglobinémies congénitales par déficit en diaphorase avec arriération mentale (84). Le mécanisme des troubles neurologiques demeure inexpliqué.

Les sujets hétérozygotes ne sont en général pas méthémoglobinémiques, mais plus susceptibles que les sujets normaux aux poisons méthémoglobinisants. L'administration de bleu de méthylène à raison de 1 à 2 mg/kg/jour par voie intraveineuse ou 5 à 10 mg/kg/jour per os ou de vitamine C, entraîne la disparition de la cyanose.

MÉTHÉMOGLOBINE-RÉDUCTASE $NADPH_2$ dépendante.

Cet enzyme pratiquement inexploré est capable de transférer les électrons du $NADPH_2$ sur la méthémoglobine, mais seulement en présence d'un intermédiaire d'oxydo-réduction comme le bleu de méthylène. C'est grâce à cette propriété des globules rouges que WARBURG et CHRISTIAN découvrirent en 1930 le NADP et la G6PD. Il est encore très mal connu et sa structure est controversée, de même que la séquence exacte du transfert des électrons. Quant à son rôle physiologique, il demeure inéclairci. En effet la réaction de réduction de la méthémoglobine par la méthémoglobine-réductase à $NADPH_2$ exige la présence d'un transporteur artificiel d'électrons (bleu de méthylène, bleu de toluidine, bleu de Nil), qu'aucun cofacteur naturel connu ne serait susceptible de remplacer. En présence de cet intermédiaire, l'enzyme peut d'ailleurs transférer activement les électrons non seulement sur la méthémoglobine, mais aussi sur le cytochrome c réduit et même sur l'oxygène. Il s'agit donc d'une $NADPH_2$-oxydase, et son activité sur la méthémoglobine paraît n'être qu'un épiphénomène. Certains considèrent cet enzyme "infirme" comme un vestige de la chaîne respiratoire atrophiée dans le globule rouge.

Cet enzyme est pourtant important à plus d'un titre. Expérimentalement il explique l'effet activateur du bleu de méthylène sur le shunt des pentoses en permettant la réoxydation du $NADPH_2$ qui est le facteur limitant de cette voie métabolique. Du point de vue thérapeutique, il rend compte de l'effet spectaculaire du bleu de méthylène dans les méthémoglobinémies par déficit en diaphorase.

DIAGNOSTIC DE L'ANOMALIE ENZYMATIQUE.

On dispose essentiellement de deux épreuves : d'une part le dosage de la diaphorase selon la méthode décrite par SCOTT (78), et d'autre part l'épreuve de réversion de la méthémoglobine.

Les sujets atteints sont homozygotes et le déficit est pratiquement total. Chez les sujets hétérozygotes, on trouve un taux d'activité intermédiaire. L'épreuve de réversion de la méthémoglobine dans les globules rouges traités par le nitrite, permet d'explorer directement les voies de réduction de la méthémoglobine et indirectement la formation des coenzymes nécessaires. On compare toujours la réduction de la méthémoglobine dans les hématies avec et sans bleu de méthylène. En présence de glucose ou d'inosine sans bleu de méthylène, seule la diaphorase est mise en jeu, alors qu'en présence de colorant, la méthémoglobine-réductase à $NADPH_2$ intervient. L'adjonction de bleu de méthylène accélère considérablement le phénomène de réduction intraérythrocytaire. Il est donc possible de différencier nettement la voie lente de la diaphorase (plus de 50 p.cent de méthémoglobine résiduelle à la 5e heure) de la voie rapide de la méthémoglobine-réductase à $NADPH_2$ (la totalité de la méthémoglobine a disparu en 2 heures) (cf. figure 13).

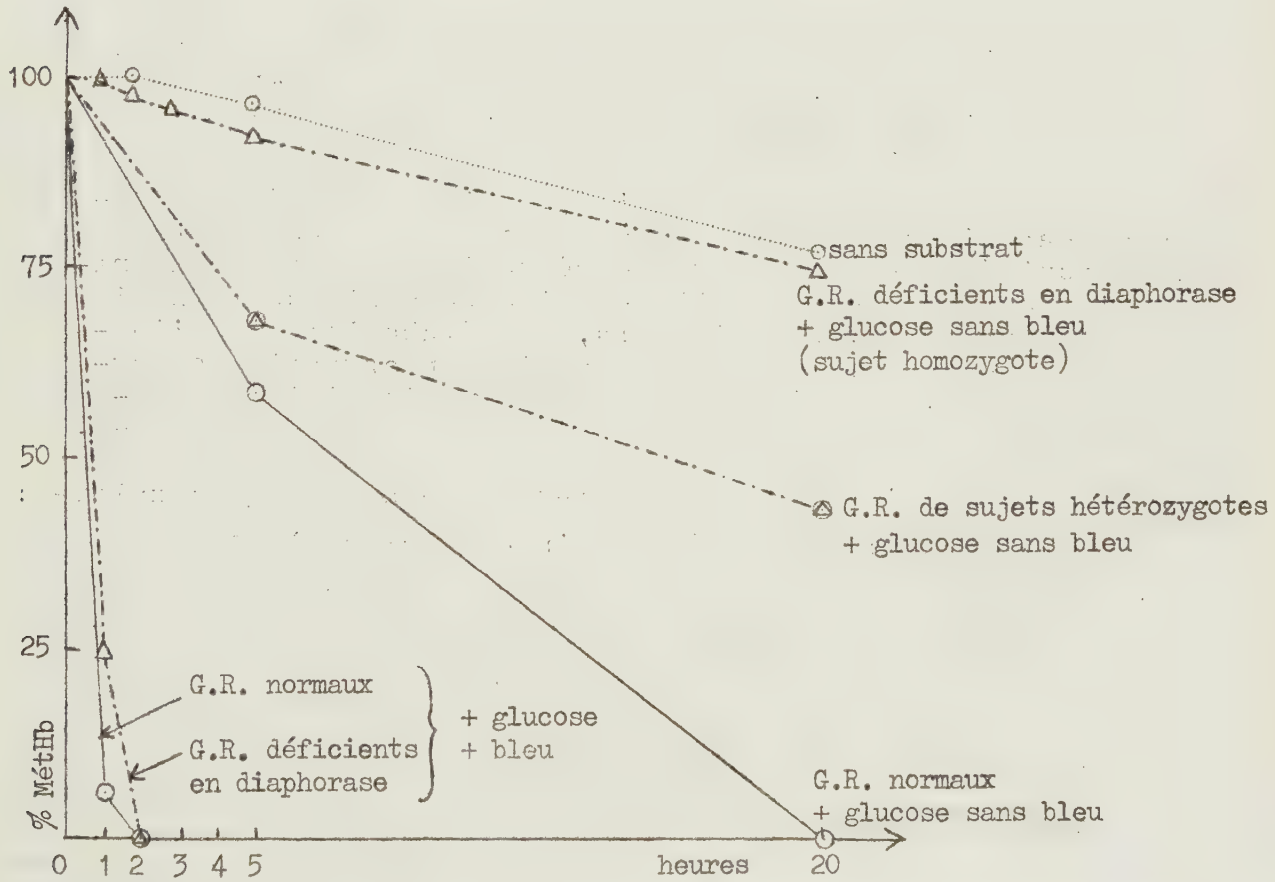


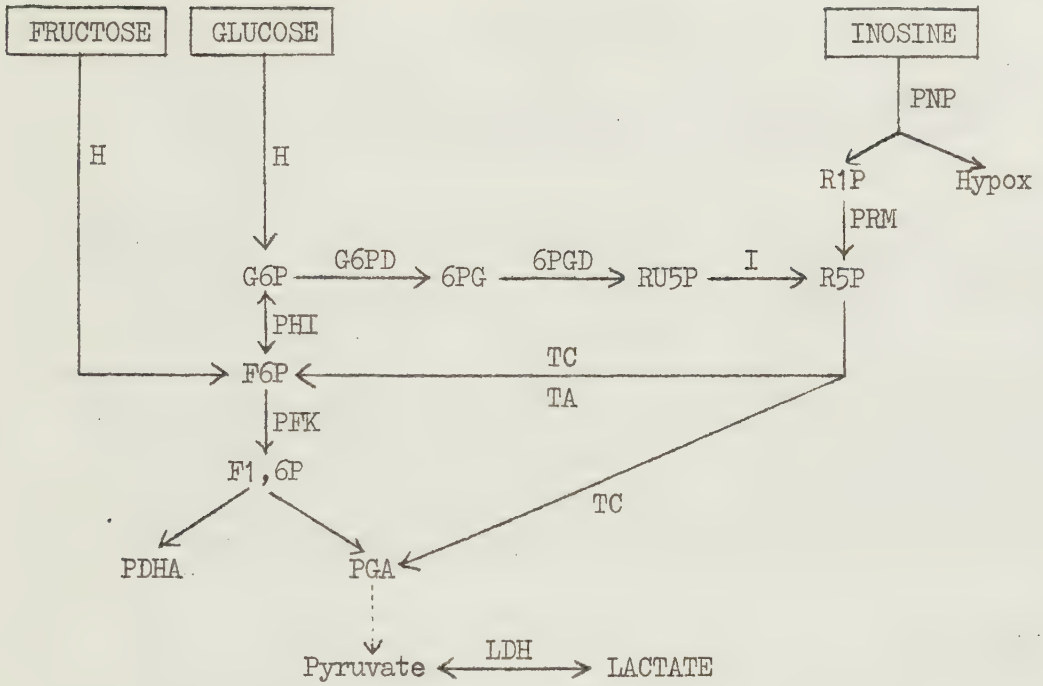

Fig. 13 - Epreuve de réversion de la méthémoglobine dans les globules rouges des sujets déficients en diaphorase homozygotes et hétérozygotes (d'après une étude de KAPLAN (84 bis) ).

D'après ce que l'on sait sur les voies métaboliques dans le globule rouge, on peut affirmer qu'au cours de l'épreuve de réversion de la méthémoglobine les séquences métaboliques suivantes sont explorées :

- avec glucose sans bleu de méthylène :
  - directement : la diaphorase
  - indirectement : la génération du $NADH_2$ et la glycolyse
- avec glucose et bleu de méthylène :
  - directement : la méthémoglobine-réductase à $NADPH_2$
  - indirectement : la génération du $NADPH_2$ et la voie des pentoses
- avec inosine sans bleu de méthylène :
  - directement : la diaphorase
  - indirectement : le métabolisme de la copule glucidique des nucléosides puriques mettant en jeu une purine-nucléoside-phosphorylase, une phosphoribose-isomérase, puis les enzymes de la deuxième partie du cycle des pentoses : transcétolase et transaldolase.

Ce métabolisme ne consomme pas d'ATP, puisque les étapes catalysées par l'hexokinase et la phosphofructokinase sont court-circuitées. La cinétique de réduction est donc plus rapide qu'avec le glucose et elle est indépendante du taux d'ATP des érythrocytes. Par ailleurs, le métabolisme de l'inosine met en jeu exclusivement la partie non oxydative du cycle des pentoses, ce qui permet d'évaluer l'activité transcétolasique et transaldolasique du globule rouge (figure 14).

- En présence d'inosine et de bleu de méthylène, on explore :
  - directement : la méthémoglobine-réductase à $NADPH_2$
  - indirectement : la même séquence que dans le système sans bleu de méthylène avec en plus la partie oxydative du cycle des pentoses.
- En présence de lactate, on explore :
  - directement : la diaphorase
  - indirectement : la lactico-déshydrogénase.




| | | | |
|---|---|---|---|
| R1P : | ribose-1-phosphate | TC : | transcétolase |
| R5P : | ribose-5-phosphate | TA : | transaldolase |
| PDHA : | phospho-dihydroxyacétone | LDH : | lactico-déshydrogénase |
| PGA : | 3-phosphoglycéraldéhyde | H : | hexokinase |
| Hypox : | hypoxanthine | PHI : | phospho-hexose-isomérase |
| PNP : | purine-nucléoside-phosphorylase | PFK : | phospho-fructo-kinase |
| PRM : | phospho-ribomutase | I : | isomérase |

Fig. 14 - Métabolisme de l'inosine dans le globule rouge.

Le problème de diagnostic posé par les méthémoglobinémies congénitales est donc celui d'une cyanose apparue dès la naissance. Le plus souvent les malades sont considérés comme porteurs d'une cardiopathie congénitale cyanogène. Mais la discordance entre l'intensité de la cyanose et la discrétion des signes fonctionnels à l'auscultation et lors des examens complémentaires (électrocardiogramme, hémogramme) doit orienter le clinicien vers la possibilité d'une méthémoglobinémie congénitale, soit due à la présence d'une hémoglobine M, soit provoquée par un déficit en diaphorase. Malheureusement devant la complexité et la finesse des techniques de dépistage, bon nombre de ces affections demeurent inexplorées et la mise en évidence de telles anomalies est encore tributaire de laboratoires hautement spécialisés.

## Chapitre XII

## GLUCOSE-6-PHOSPHATE-DÉSHYDROGÉNASE

En 1954, DERN et coll.(85) montrèrent pour la première fois chez des Noirs américains de sexe masculin, que la susceptibilité particulière au pouvoir hémolysant de la primaquine était due à un défaut intrinsèque des érythrocytes. Par la suite et indépendamment, CARSON et coll.(86) en 1956, mettent en évidence l'agent causal de cette hémolyse, à savoir le déficit érythrocytaire en G6PD. En 1957, WALLER et coll.(87) découvrirent eux aussi chez un sujet d'origine iranienne atteint d'anémie hémolytique, un déficit en G6PD. L'étude des familles montre clairement que ce déficit enzymatique est d'origine génétique et qu'il est lié au sexe.

RAPPEL CLINIQUE.

1°) Anémie hémolytique du sujet de race noire (88,89,90):

Elle correspond à un déficit enzymatique partiel de 75 à 85 p.cent. L'accès hémolytique est toujours provoqué par l'absorption de substances médicamenteuses dont la liste s'allonge d'année en année et qui sont pour la plupart des analogues structuraux à noyau aminoquinoléique ou aromatique aminé. Le tableau VI reproduit les principaux produits mis en cause.

L'histoire clinique comprend trois épisodes successifs:

- une phase aiguë : l'anémie apparaît dès la 48ème heure après le début de l'absorption. Elle s'installe rapidement et atteint son maximum vers le 8e-10e jour. Le nombre des globules rouges chute de 30 à 50 p.cent. Cet accès hémolytique cesse spontanément, même si on poursuit l'administration du médicament.

- une phase de récupération qui s'étend du 10e au 40e jour environ. La réticulocytose apparaît, l'anémie se corrige lentement et la numération globulaire revient à la normale vers la 4e ou la 5e semaine.

- une phase d'équilibre lui succède. Il n'y a plus d'anémie, mais l'hémolyse persiste. Celle-ci est compensée par une augmentation de l'érythropoïèse. Un accès aigu peut néanmoins être déclenché à ce stade par l'augmentation des doses du produit responsable. Si l'on arrête la prise du médicament et que l'on reprenne l'administration de la drogue précocement, aucune nouvelle poussée hémolytique n'apparaît, mais la re-

Tableau VI

Produits et circonstances accusés de provoquer une crise hémolytique chez les sujets à insuffisance érythrocytaire en G6PD.

1°) Antipaludéens :

quinine
quinocide
quinacrine
primaquine
pamaquine (Praéquine *)
pentaquine

2°) Sulfamides :

sulfanilamide (1162 F, Septoplix *)
n-acétylsulfanilamide
sulfacétamide (Albucid *)
sulfaméthoxypyridazine (Sultirène *)
salicylazosulfapyridine (Salazopyrine *)
sulfisoxazole (Gantrisine *)
sulfaméthizol (Thiosulfil *)
sulfadiazine (Adiazine *)
tolbutamide (Dolipol *)

3°) Sulfones :

sulfoxone (Diasone *)
thiazosulfone (Promizole *)

4°) Antipyrétiques et analgésiques :

Aspirine *
Acétanilide
Phénacétine
Pyramidon *
Antipyrine

5°) Nitrofuranes :

furazolidone (Furoxone *)
nitrofurantoïne (Furadoïne *)
nitrofurazone
furaltadone

6°) Divers :

pyridium (Mallophène *)
probénécid (Bénémid *)
P.A.S. *
acétylphénylhydrazine
B.A.L. *
bleu de méthylène
naphtalène
Ménadione *
Phénothiazine *
chlorpromazine (Largactil *)
Chloramphénicol *
quinidine
trinitrotoluène

7°) Produits végétaux :

Fèves, fèvettes et certains haricots
Pois verts, pois chiches, artichauts, asperges
Figues de barbarie
Verveine (Verbena hybrida)
Cyclamen, lupin, genêt
Bois puant (Anagyris foetida)
Morille (Morchella esculenta)
Fougère mâle

8°) Infections bactériennes et virales.

prise du traitement après trois ou quatre mois déclenche une récidive de l'hyperhémolyse parce que la population érythrocytaire comprend à nouveau un nombre important d'hématies vieillies.

2°) Anémie hémolytique aiguë du sujet de race blanche (91, 92) :

Elle ressemble dans ses grandes lignes à la précédente. Les différences semblent tenir au caractère plus marqué du déficit enzymatique qui atteint ici 2 à 15 p.cent de la valeur normale. Les causes déclenchantes sont plus nombreuses. Le rôle toxique de la quinine, de la quinidine, de la quinacrine, n'a jusqu'ici été rapporté que chez le Blanc. Une statistique récente insiste même sur certaines infections bactériennes et virales, ainsi que sur l'acidoacétose du diabétique. L'accès hémolytique présente un caractère très sévère : l'hémoglobinurie est parfois telle qu'elle se complique d'anurie. Le déficit enzymatique est non seulement plus profond, mais aussi plus diffus, puisqu'il s'observe également dans les leucocytes et les plaquettes.

3°) Le favisme (93, 94) :

Chez les faviques il existe un déficit en G6PD. Ces sujets sont également sensibles aux mêmes substances que le sujet enzymopénique. En revanche, les sujets enzymopéniques ne sont pas tous sensibles aux fèves, ce qui conduit à invoquer dans cette affection, des facteurs surajoutés : facteur de protection sérique de ROTH, facteur immunologique. Il est intéressant de noter que si la plupart des individus porteurs de la tare sont très sensibles aux fèves crues, d'autres sont aussi sensibles aux fèves cuites et même aux poussières de pollen de fèves.

4°) L'anémie hémolytique chronique avec déficit en G6PD (95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109) :

Elle n'a fait l'objet que d'une quarantaine d'observations, toutes rapportées chez des sujets de race blanche, sauf un cas japonais. Elle réalise le tableau d'une anémie hémolytique chronique entre-coupée d'accès aigus. Le début de la maladie est précoce. L'ictère néo-natal est noté dans plus de la moitié des cas. L'anémie est généralement modérée. Les globules rouges sont d'aspect normal. La résistance globulaire est inconstamment augmentée. La durée de vie des hématies marquées au $Cr_{51}$ est habituellement diminuée. Il existe vraisemblablement des formes atténuées de ces hémolyses chroniques par déficit en G6PD. Une observation de MOHLER et

CROCKETT (105) concerne un adulte n'ayant pas de signes cliniques d'hémolyse, pas d'anémie, mais porteur d'un subictère chronique à bilirubine non conjuguée, et suspect de ce fait, de syndrome de Gilbert. Bien qu'il ait été demontré que les hématies étaient capables de fixer la bilirubine non conjuguée, il n'y a pas lieu de penser que cette fixation entraîne une hyperhémolyse, puisque dans la vraie cholémie familiale avec trouble de la glycuro-conjugaison, la durée de vie des hématies est normale.

5°) L'ictère hémolytique néo-natal sans incompatibilité foeto-maternelle :

Il est particulièrement fréquent en Grèce (110, 111, 112) et en Italie (113, 114). L'aspect clinique et hématologique est celui d'une hémolyse néo-natale sans autre particularité que l'absence d'incompatibilité Rhésus ou ABO. Le début est très précoce, à la naissance ou le lendemain. L'exsanguino-transfusion est souvent nécessaire et l'ictère nucléaire est possible (115). Si selon GABURRO certains déficits constatés à cette période de la vie seraient transitoires, le plus souvent l'ictère néo-natal est un accident révélateur d'une sensibilité médicamenteuse. Cependant bon nombre de ces nouveaux-nés ne font pas par la suite de nouvelles poussées hémolytiques. Cette hypothèse se trouve confirmée par l'une de nos études d'un cas de déficit passager en G6PD par immaturité enzymatique. Par ailleurs, tous les nouveaux-nés déficients en G6PD sont loin de faire une hémolyse néo-natale. Aussi des causes externes ont-elles été invoquées : application de naphtalène par l'intermédiaire des couches, de préparations antiseptiques sur l'ombilic ou l'administration de vitamine K hydrosoluble, administration à la mère dans les derniers jours de la grossesse de certains médicaments.

RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE.

Le déficit en G6PD est la cause la plus fréquente des anémies hémolytiques congénitales non sphérocytaires. Il atteint plus de 100 millions d'individus à travers le monde. La susceptibilité à l'hémolyse est l'apanage de la race noire, de certaines souches israélites sépharades, ainsi que de quelques groupes ethniques méditerranéens, comme les Sardes et les Grecs. Les statistiques révèlent les chiffres suivants:

Noirs américains : 10 à 15 p.cent.

Noirs d'Afrique : 1 à 25 p.cent suivant les régions

Nigériens : 10 p.cent

Bantous : 20 p.cent.

Dans la race blanche, la tare se rencontre surtout autour du bassin méditerranéen :

Sardaigne : 20 à 30 p.cent sur la côte.
Kurdes : 23 p.cent.
Grèce : 2 p.cent.
Yéménites : 8 p.cent.
Algérie : 3 p.cent.

En Europe Centrale :

Caucase : 28 p.cent.

Au Proche et Moyen-Orient :

Irak : 25 p.cent.
Iran : 15 p.cent.
Indiens : 3 à 8 p.cent.

Dans la race jaune, l'incidence est d'environ 5 p.cent chez le nouveau-né. Ce taux atteint 15 p.cent à Hong-Kong selon une étude de LAI et coll.(116). Le déficit est par contre très peu répandu chez les Coréens (117) où il est inférieur à 0,9 p.cent. Il atteint 0,33 p.cent à Formose, 1,6 p.cent en Chine Continentale, 2,5 p.cent à Singapour.

En Europe Centrale par contre, la fréquence n'est que de 0,2 p.cent.

Parmi les facteurs étiologiques, le favisme tient la première place. Cette affection, courante sur les rivages nord de la Méditerranée et en Asie du Sud-Est, serait rare au Moyen-Orient et en Egypte. Il faut souligner que de nombreux cas restent inconnus, ainsi que le soulignent MESSERSCHMITT et coll. (118), dans une étude entreprise en Algérie. En effet, l'abondance des fèves dans l'alimentation et l'insuffisance de l'infrastructure médicale dans la campagne, peuvent faire supposer que cette affection est courante, mais ignorée.

Il faut remarquer que la tare est répandue dans les régions où les hémoglobinopathies sont fréquentes. Nous le retrouvons dans une étude de FRASER et coll.(119), menée dans deux villages de la province d'Arta en Grèce. La fréquence du déficit en G6PD, le trait sicklémique A/S et la β-thalassémie était similaire. L'association à la drépanocytose était la plus fréquente. Ceci s'expliquerait par l'union avec des femmes originaires d'autres régions et qui auraient introduit le déficit en G6PD dans ces localités.

La fréquence du déficit en G6PD est aussi importante dans les zones où sévit le paludisme à l'état endémique et il est probable que la tare confère une résistance particulière vis-à-vis de cette parasitose aux populations indigènes.

TRANSMISSION GÉNÉTIQUE.

La transmission du déficit en G6PD est liée au sexe. En 1958, CHILDS (120), à la suite d'une étude sur la répartition de la tare dans la population Noire des Etats-Unis, constate que les sujets de sexe masculin sont soit normaux, soit identiquement déficitaires, alors que les sujets de sexe féminin sont soit normaux, soit déficitaires, mais que ce déficit a une expression d'importance variable, le plus souvent intermédiaire. Il en conclut que le trait "déficit en G6PD" est transmis par une hérédité liée au sexe avec dominance incomplète du chromosome porteur du gène mutant ou X sur le chromosome normal x . L'homme porteur de la tare ne pouvant être qu'hémizygote XY, le trait s'exprime complètement chez lui et le rend hypersensible. La femme porteuse de la tare peut être soit homozygote XX, le trait s'exprime complètement et la femme est hypersensible, soit hétérozygote Xx, le trait est atténué dans son expression par le gène normal d'une façon plus ou moins importante et la femme est soit intermédiaire, soit normale.

Pour expliquer les variations du taux de G6PD chez les femmes hétérozygotes, BEUTLER et coll. (121), exploitant l'hypothèse de M. LYON (122), suggèrent que la femme est une mosaïque composée de deux populations cellulaires, l'une ayant un X actif, alors que l'autre population aurait un chromosome X inactif. Pour démontrer l'existence de ces deux populations, ils étudient les courbes de dissociation du glutathion réduit en utilisant des globules rouges normaux, des globules rouges enzymopéniques et un mélange des deux. Dans un second temps, ils réalisent la même expérience avec des globules rouges de femmes hétérozygotes conductrices et obtiennent des courbes identiques à celles obtenues avec le mélange des globules rouges normaux et déficitaires. Par la suite, BEUTLER et BALUDA (123) utilisent des érythrocytes drépanocytaires de femmes porteuses à la fois de la tare drépanocytaire comme hétérozygote et transmettrices du déficit en G6PD. Ils les méthémoglobinisent en présence de nitrites et les soumettent à une atmosphère pauvre en oxygène. Seules les cellules qui ne contiennent pas de méthémoglobine, c'est-à-dire G6PD normales, subissent la falciformation. La filtration sur millipore permet ensuite de séparer deux types de cellules : les unes,G6PD déficientes, qui traversent le filtre, les autres, G6PD normales, qui sont retenues par le filtre parce que falciformées.

Enfin l'observation dans certaines familles du daltonisme, tare liée au chromosome sexuel X, et du déficit en G6PD a montré la ségrégation identique des deux tares. Le groupe sanguin $Xg^a$, seul groupe connu pour être lié au sexe, a une transmission identique à celle du déficit en G6PD.

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES.

La G6PD des hématies a été partiellement purifiée et étudiée par KIRKMAN (124) d'une part, CHUNG et LANGDON (125) d'autre part. Le premier auteur, par fixation sur DEAE-cellulose et élution suivie de fractionnement par le sulfate d'ammonium puis l'acétone et d'absorption sur phosphate de calcium, obtient un enzyme concentré environ 10 000 fois; les seconds aboutissent à une concentration de 43 500 fois. Après électrophorèse, l'enzyme semble pratiquement pur. Le poids moléculaire de l'enzyme purifié est estimé à 105 000 pour KIRKMAN et à 190 000 pour CHUNG et LANGDON. Dans une récente étude, RATTAZZI (126), après traitement par la DEAE-cellulose et précipitation par le sulfate d'ammonium puis passage sur colonne de Sephadex G 200, obtient un pic à l'élution compris entre l'haptoglobine et l'albumine. Il considère le poids moléculaire de l'enzyme comme étant égal à 104 000 $\pm$ 3 000. Tous ces auteurs sont d'accord pour affirmer que la G6PD active se trouve sous la forme d'un dimère dont les deux chaînes polypeptidiques sont étroitement liées en présence de NADP. L'extraction par le sulfate d'ammonium du NADP lié, sépare la molécule de G6PD en deux monomères dont le poids moléculaire est la moitié de celui du dimère. Un traitement des monomères par le NADP permet la reconstitution du dimère et restaure l'activité enzymatique. Les deux chaînes peptidiques diffèrent par leur $NH_2$ terminal identifié comme la tyrosine pour l'une, l'alanine pour l'autre. La fixation du NADP sur l'enzyme explique l'action stabilisatrice de ce corps, cependant il devient inhibiteur à forte concentration. Les derniers travaux de BONSIGNORE et coll.(127, 128), s'attachent à l'étude des inhibiteurs et des activateurs de la G6PD ainsi qu'au changement de la structure quaternaire de l'enzyme lors de leur action. En incubant des globules rouges lavés en présence de glucose-6-phosphate, de 6-phospho-gluconate ou de $NADPH_2$, on note une perte progressive de l'activité de la G6PD. Cette inactivation est fonction de la concentration en métabolite, de la température, des tampons et du pH. Par contre, le NADP protège la G6PD de cette action inhibitrice. Le glucose, l'acide gluconique et le $NADH_2$ libres n'ont pas d'action sur la stabilité de la G6PD à 37°C, de même que le radical "phosphate" pris séparément. Les groupements phosphorés interviendraient donc dans les mécanismes de protection et d'inactivation de l'enzyme lorsqu'ils sont liés au substrat. Il est possible de réactiver la G6PD inactive en présence de NADP, d'EDTA et de groupements SH tel le $\beta$-mercaptoéthanol ou le glutathion réduit à pH légèrement alcalin suivi d'une incubation à 37°C . Ces propriétés ont été démontrées par l'ultracentrifugation. Ainsi la forme active de l'enzyme a une constante de sédimentation de $S_{20} = 6,03$ contre $S_{20} = 4,53$ pour la forme inactive. La recombinaison des sous-unités à $S_{20} = 4,53$ redonne la forme de

départ $S_{20}$ = 6,03. Cet équilibre a été confirmé par la filtration sur gel de Séphadex G 200. L'enzyme des hématies est inhibé par le paramercuribenzoate et les métaux lourds, ce qui permet de supposer la présence des groupes SH actifs, d'autant que cette inhibition est levée par la cystéine. Il est également inactivé par l'urée 6 M, mais non par l'iodoacétate. La G6PD des hématies humaines a un assez haut degré de spécificité pour le substrat G6P, mais elle utilise aussi certains analogues structuraux tels le 2-désoxyglucose-6-phosphate et le galactose-6-phosphate, à des degrés beaucoup moindre que le G6P. RIMON, ASKENAZI et RAMOT (129) montrent un effet activateur du stroma érythrocytaire de sujets à activité G6PD normale vis-à-vis des hémolysats de sujets sensibles. Par contre, le stroma de sujets sensibles ne montre pas cette propriété vis-à-vis des hémolysats de sujets normaux. C'est là la première démonstration d'un déficit en un facteur absent du stroma et qui serait un activateur de la G6PD. Cet activateur présenterait une action enzymatique. Mais KIRKMAN dans des tentatives de correction de déficits par des stromas normaux n'obtenait que des échecs. On peut actuellement considérer comme une quasi certitude que la restauration d'activité observée était en réalité due à la libération par les stromas normaux d'une certaine quantité d'enzyme qui y était restée fixée. RAMOT (130) lui-même, s'est rallié à cette opinion.

VARIANTES ÉLECTROPHORÉTIQUES.

La mobilité électrophorétique de la G6PD peut être étudiée après migration sur gel d'amidon. L'enzyme est alors révélé par réduction du nitro-bleu-tétrazolium. Dans ces conditions divers types de G6PD ont été identifiés, différents par leur mobilité électrophorétique. C'est ainsi que BOYER (131) trouve deux bandes et avec d'autres types de tampons KIRKMAN (132) met en évidence des bandes secondaires à côté de la tache principale. BONSIGNORE (133) a étudié ces différents types par leur

- activité enzymatique
- mobilité électrophorétique
- Constante de Michaëlis vis-à-vis du G6P et du NADP
- affinité pour les analogues structuraux du G6P
- stabilité de l'enzyme par inactivation à 37°C
- courbe d'activité en fonction du pH.

De nombreuses variétés érythrocytaires ont été décrites. Certaines, isolées par des auteurs différents, sont probablement identiques, mais vu la faible quantité d'enzyme et leur instabilité, les comparaisons sont difficiles. L'anomalie peut porter sur une seule ou plusieurs de ces caractéristiques qui n'ont pas été toutes constamment étudiées. Le trouble peut être soit

qualitatif, portant sur un gène de structure, soit quantitatif et porter sur un gène régulateur. La possibilité de séparer les chaînes peptidiques et de les recombiner, devait conduire à des tentatives d'hybridation. On pensait ainsi localiser avec plus de précision l'anomalie et la situer sur l'une des deux chaînes polypeptidiques. Ces tentatives sont malheureusement restées sans résultats chez l'homme. Récemment cependant, BEUTLER (134) a hybridé l'enzyme B de l'homme et du rat par recombinaison en présence de NADP. Il apparaît ainsi une nouvelle tache à l'électrophorèse.

Le déficit rencontré chez les sujets de race noire, sensibles à la primaquine est essentiellement caractérisé par la diminution de l'enzyme A ; c'est la raison pour laquelle cette variété est dénommée A-. Bien que certains auteurs aient noté une mobilité électrophorétique très légèrement supérieure de A- par rapport à A , il est pratiquement impossible actuellement de reconnaître à A- une différence d'avec A+ quant à cette propriété. Cependant LUZZATTO et coll.(135), sur des préparations hautement purifiées, auraient trouvé des différences entre A et A-. Il est connu que certaines populations juives et celles du pourtour méditerranéen sont atteintes avec une assez grande fréquence de déficit en G6PD. Chez les sujets mâles de ces régions porteurs du déficit, le taux d'enzyme trouvé est de l'ordre de 2 à 15 p.cent de la normale. L'enzyme B est le type physiologique de ces races. Il semble que le peu d'activité enzymatique qui persiste chez les sujets déficitaires, soit lié à un enzyme indistinguible de B par sa mobilité électrophorétique, mais différent de lui par ses autres propriétés. Les Constantes de Michaëlis pour le G6P et le NADP sont diminuées, l'affinité pour le 2dG6P et le Gal6P est augmentée et la perte de spécificité de l'enzyme est encore attestée par l'utilisation relative du NAD comme coenzyme. L'enzyme est plus labile que B, la courbe d'activité en fonction du pH est bimodale.

Les principales variantes électrophorétiques sont résumées dans les tableaux VII, VIII et IX.

MÉCANISME DE L'HÉMOLYSE.

Le mécanisme de l'hémolyse au cours des déficits en G6PD est mal connu. Du fait du rôle primordial de l'enzyme dans la régénération du $NADPH_2$, c'est dans l'atteinte des systèmes d'oxydo-réduction que l'on a pensé trouver la cause directe ou indirecte de l'hyperhémolyse. C'est d'abord la diminution du glutathion réduit qui a été envisagée. Mais JACOB et JANDL (136, 137) ont montré que ce n'était pas tellement l'inhibition du GSH lui-même que celle des groupes sulfhydryles de la membrane cellulaire qui pouvait être responsable de l'hyperhémolyse. SZEINBERG et CLEJAN (138) ont montré par la suite la diminution

Tableau VII

Variantes s'accompagnant d'une activité enzymatique normale.

| Type | Race | Activité (en p.cent) | Mobilité électrophorétique | Km G6P | Km NADP | Affinité pour 2dG6P | Affinité pour Gal6P | Stabilité | Activité en fonction du pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A (131) | noire | 100 | A | N | N | N | N | N | N |
| B (148) | blanche | 100 | B | N | N | N | N | N | N |
| Austin I (149) | noire | 75 | plus lent que B | N | N | N | N | N | N |
| Austin II (149) | noire | 90 | plus lent que Austin I | N | N | N | N | N | N |
| Baltimore (150) | noire | 100 | plus lent que B | - | - | - | - | - | - |
| Ibadan (150) | noire | 100 | - | - | - | - | - | - | - |
| Sardaigne I (150) | blanche | - | plus lent que Baltimore<br>plus lent que Ibadan | - | - | - | - | - | - |
| Sardaigne II (150) | blanche | - | plus lent que Sardaigne I | - | - | - | - | - | - |

Tableau VIII

Variantes s'accompagnant d'une activité enzymatique diminuée sans modifications hématologiques.

| Type | Race ou origine | Activité (en p.cent) | Mobilité électrophorétique | Km G6P | Km NADP | Affinité pour 2dG6P | Affinité pour Gal6P | Stabilité | Activité en fonction du pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Seattle (151) | Anglo-saxonne | 8 à 21 | plus lent que B | ↙ | ↙ | ↗ | ↗ | N | Bimodale |
| Tel Hashomer (152, 153) | Juive | 15 à 25 | plus lent que B | ↙ | - | ↗ | - | N | Normale |
| D (154) | Anglo-saxonne | 8 à 16 | plus lent que B | - | - | - | - | - | - |
| Barbiéri (155) | Italienne | 50 | plus rapide que B | ↗ | ↗ | - | - | N | - |
| Canton (156, 157) | Chinoise | 4 à 24 | entre A et B | ↙ | ↙ | ↗ | ↗ | ↙ | Bimodale |
| Madison (158) | Norvégienne | - | plus lent que B | - | - | - | - | - | - |
| Paris III (159) | Grecque | 2,5 | identique à B | ↙ | - | - | - | - | Anormale |
| Kerala (160) | Indes | 50 | identique à B en tampon TRIS plus lent que B en tampon TEB | ↙ | ↙ | ↗ | ↗ | N | Bimodale |
| West Bengal (160) | Indes | 9 | plus lent que B | ↙ | ↗ | N | N | N | Normale |

Tableau IX

Variantes s'accompagnant d'une activité enzymatique diminuée avec modifications hématologiques.

| Type | Race ou origine | Modifications hématologiques | Activité en (p. cent) | Mobilité électrophorétique | Km G6P | Km NADP | Affinité pour 2dG6P | Affinité pour Gal6P | Stabilité | Activité en fonction du pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A - (161) | noire | sensibilité à la primaquine | 15 à 25 | A ou un peu plus rapide que A | N | N | - | - | N | Normale |
| B - (162) (163) | Juifs - Grecs Italiens | hémolyse médicamenteuse favisme | 2 à 15 | B ou peu différente de B | ↙ | ↙ | ↗ | ↗ | ↙ | Bimodale |
| Oklahoma (164) | blanche | AHCN | 9 | N | ↗ | ↗ | N | - | ↙ ++ | Pic étroit |
| Chicago I (165) | blanche | AHCN | 9 à 26 | N | N | N | N | - | ↙ +++ | Normale |
| Eyssen (150) | blanche | AHCN | 0 | plus rapide que B | - | - | - | - | ↙ +++ | - |
| Marks, coll. (155) | blanche | AHCN | 0 | - | ↗ | - | - | - | ↙ | Anormale |
| Chine (Wong, coll.) | Chinois | AHCN | 0 à 15 | B ou plus rapide que B | ↙ | - | ↗ | ↗ | - | Normale |
| Westring et Pisciotta (166) | Porto-Ricain | AHCN | 1 | plus lent que B | ↗ | - | - | - | - | Anormale |
| Tübingen (167) | Russie - Hollande | AHCN | 0,3 | - | ↙ | ↙ | - | - | - | - |
| Paris I (159) | blanche | AHCN | 0 à 10 | - | ↗ | - | - | - | ↙ ++ | Anormale |
| Paris II (159) | blanche | AHCN | 0 | N | ↗ | - | - | - | - | Anormale |
| Joliet I (168) | noire | sensibilité médicamenteuse | 50 | B | N | - | - | - | - | Normale |
| Joliet II (168) | noire | sensibilité médicamenteuse | légèrement diminuée | plus lent que A | - | - | - | - | - | - |
| Joliet III (168) | noire | sensibilité médicamenteuse | 25 à 30 | A | - | - | - | - | - | - |
| Albuquerque (169) | anglaise | AHCN | 1 | N | ↗ | ↗ | ↙ | - | - | Normale |
| Duarte (169) | Irlande - Hollande | AHCN | 8,5 | N | N | N | ↗ | - | - | Anormale |

AHCN = anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire.

des groupements SH lors des déficits en G6PD. Ceci expliquerait la baisse simultanée de l'hexokinase qui possède six groupements SH. Mais contre cette hypothèse, on relève le fait que la glyoxalase n'a jamais été trouvée abaissée.

Pour COHEN et HOCHSTEIN (139), les agents hémolysants conduiraient à la formation d'un peroxyde d'hydrogène. Ils attirent l'attention sur le rôle de la glutathion-peroxydase dans la réduction de ce peroxyde d'hydrogène, réduction couplée à celle de la réduction du glutathion.

Selon le schéma proposé par MOHLER et CROCKETT (105), la suite des réactions serait la suivante :

$$G.R. + \text{substance oxydante} \longrightarrow H_2O_2$$

$$H_2O_2 + 2\ GSH \xrightarrow[\text{glutathion-peroxydase}]{} 2\ H_2O + GSSG$$

$$GSSG + NADPH_2 \xrightarrow[\text{glutathion-réductase}]{} 2\ GSH + NADP$$

$$G6P + NADP \xrightarrow[G6PD]{} 6PG + NADPH + H^+$$

L'insuffisance de production du $NADPH_2$ due au déficit en G6PD conduirait à l'incapacité de maintenir le taux de GSH en présence de peroxyde d'hydrogène. Plusieurs auteurs (140, 141, 142, 143) ont mis en évidence des anomalies du métabolisme de l'ATP. L'incubation de telles hématies en présence d'acétylphénylhydrazine ou de primaquine s'accompagne d'une chute anormalement rapide de l'ATP érythrocytaire, sans que l'adjonction de glucose n'entraîne aucune protection. Cette diminution pourrait être partiellement expliquée par l'inhibition des réactions enzymatiques de la voie d'Embden-Meyerhof qui sont plus actives en présence de glutathion réduit, en particulier la glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase et l'hexokinase.

A la suite des travaux de WEED et coll.(144, 145), montrant les effets de la primaquine sur la perméabilité de la membrane érythrocytaire vis-à-vis du $K^+$, on tend à faire jouer un rôle essentiel à une atteinte de cette membrane ayant pour conséquence une augmentation de la perméabilité vis-à-vis des ions $Na^+$ et $K^+$. Que celle-ci se fasse par l'intermédiaire d'anomalies de l'ATPase, inhibée par le blocage des groupes sulfhydryles, est possible et doit être rapproché de la diminution des groupes SH de la membrane, montrée par SZEINBERG et CLEJAN (138). Il y aurait peut-être une augmentation de la consommation d'ATP, qui cependant reste mal expliquée s'il y a inhibition de l'ATPase. Plusieurs auteurs ont dans le même sens recherché des anomalies éventuelles des lipides érythrocytaires. TARLOV (146) signale

une diminution des lipides totaux chez les sujets sensibles à la primaquine. SZEINBERG et CLEJAN (147) notent une augmentation de la sphingomyéline et une diminution de la phosphatidylsérine; par contre, après incubation en présence d'acétylphénylhydrazine et de nitrofurantoïne, ils observent une nette diminution de la phosphatidylsérine et une augmentation de la phosphatidyl-éthanolamine. La signification de ce phénomène est inconnue.

## Chapitre XIII

## 6-PHOSPHOGLUCONATE-DÉSHYDROGÉNASE

RAPPEL CLINIQUE ET BIOLOGIQUE.

Décrit pour la première fois en 1964 par BREWER et DERN (170) chez un sujet de race noire atteint de schizophrénie, ce déficit se transmet comme un simple caractère auto-somal dominant. La même anomalie a été rapportée presque simultanément par PARR et FITCH (171). Son incidence paraît être de l'ordre de 0,3 p.cent dans la race noire et de 0,7 p.cent dans la race blanche. Dans les familles étudiées par ces auteurs, tous les sujets atteints étaient asymptomatiques cliniquement et hématologiquement. Le taux d'enzyme trouvé est de l'ordre de 50 p.cent de la normale et il n'y a chez les sujets porteurs de ce déficit aucune anomalie des tests traduisant un retentissement sur les systèmes d'oxydo-réduction dépendant du $NADPH_2$ à savoir : le test de réduction de la méthémoglobine, le test de stabilité du glutathion, le test de décoloration de Motulski.

Contrastant avec les faits observés précédemment, LAUSECKER et HARTLEYB (172) d'une part, SCIALOM, NAJEAN et J. BERNARD (173) d'autre part, rapportent deux observations d'anémie hémolytique non sphérocytaire associées à un déficit en 6PGD. Dans le cas de SCIALOM et coll.(173), il s'agit d'un sujet de vingt ans, splénectomisé à l'âge de quinze ans à la suite d'un diagnostic de maladie de Minkowski-Chauffard. Ce sujet présentait une anémie avec hyperréticulocytose sans sphérocytose. La durée de vie des hématies marquées au $Cr_{51}$ était de 8 jours. Celle-ci était encore plus courte si on injectait les globules rouges du malade à un sujet sain. La T 50 était alors de 3,2 jours. L'auto-hémolyse à 37°C pendant 48 heures montrait une augmentation modérée de l'hémolyse corrigée partiellement par le glucose, mais sans action nette de l'ATP. L'utilisation du glucose-$_{14}C$ par le cycle des pentoses phosphates était diminuée chez ce malade et la production de $_{14}CO_2$ n'était pas augmentée de façon normale par le bleu de méthylène. La diminution d'utilisation du glucose-$C_1$ et du glucose-$C_2$ par rapport au glucose marqué sur tous les carbones, prouvait que le cycle aérobie était ralenti au niveau de l'une de ses deux premières étapes. Dans l'observation de LAUSECKER et coll. (172), il existait un déficit d'environ 50 p.cent avec présence de corps de Heinz dans les hématies, une instabilité marquée du glutathion réduit à l'acétylphénylhydrazine et une baisse du $NADPH_2$. Mais on trou-

vait aussi de façon paradoxale une génération insuffisante d'ATP, un déficit en $NADH_2$ et NAD et un trouble de formation du lactate. Toutes ces anomalies seraient plutôt en faveur d'un trouble de la voie catabolique anaérobie. Ainsi que SCIALOM nous le fait remarquer dans sa discussion, à propos de l'étude comparative de ces deux cas, il est difficile de comprendre le lien existant entre un déficit enzymatique modéré de la voie aérobie du glucose et une anémie hémolytique grave. L'absence d'hémolyse après administration de primaquine d'une part, l'observation de 22 cas ayant un déficit modéré en 6PGD sans aucune hyperhémolyse, sont des arguments qui font douter du lien direct entre le déficit enzymatique constaté et l'hyperhémolyse. Nous savons en effet aujourd'hui que le déficit décrit par LAUSECKER et coll.(172) n'est pas dû à une diminution de la 6PGD. Ainsi que nous le rapporterons dans un chapitre ultérieur et en accord avec le Professeur LÖHR, il s'agirait en réalité d'une anomalie de la structure du stroma ainsi qu'en témoignent les dosages des ATPases de la membrane. Cependant la cause exacte de l'hémolyse nous échappe encore et nous en sommes réduits à émettre des hypothèses.

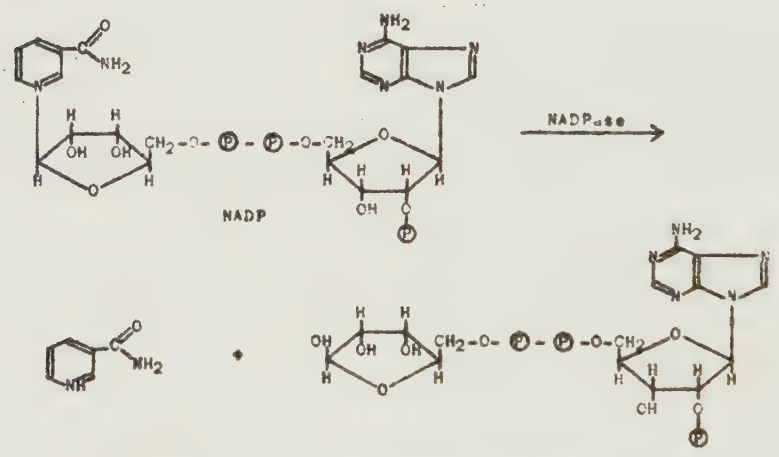
Il nous faut encore citer un cas décrit par BOIVIN et coll.(44), comme un déficit acquis et transitoire au cours d'une anémie hémolytique aiguë idiopathique avec thrombopénie chez un jeune portugais de 19 ans. Le taux de l'enzyme était de 15 p.cent de la normale. Après dix jours il passait à 70 p.cent de la normale et après deux semaines il atteignait 120 p.cent de la normale. Il constitue la première observation d'une érythroenzymopathie transitoire et régressive.

Enfin récemment, COTTE et coll.(18) rapportent le cas d'un déficit simultané en G6PD et 6PGD. Le taux de ce dernier enzyme était de 40 p.cent de la normale. Il s'agit là d'une association de deux tares, car en dépit de leur étroite relation métabolique, le gène de la 6PGD est localisé sur un autre chromosome que celui de la G6PD.

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES.

Les déficits en 6PGD étant rares et de découverte récente, cet enzyme n'a été que peu étudié à ce jour, contrairement à la G6PD. Il est cependant une propriété particulièrement intéressante à signaler. Depuis les travaux d'AJMAR et coll.(174) on sait que l'activité de la 6PGD peut être modifiée par simple incubation de l'hémolysat de globules rouges en présence des stromas. Alors qu'on note une activation de la glutathion-réductase, il y a inactivation de la 6PGD avec changement du tracé électrophorétique lorsqu'on y adjoint en plus du NADP. Il y a en effet disparition progressive de la bande principale avec apparition simultanée d'une bande plus lente et de moindre

intensité. Ces expériences nous montrent donc que ce phénomène nécessite et les stromas globulaires et le NADP. Les stromas renferment une NADPase, il devait y avoir une relation vraisemblable entre la 6PGD et la NADPase. Inversement, si on inhibe la NADPase, en ajoutant au milieu de la nicotinamide à la concentration de $10^{-1}$ M, on prévient l'inactivation de la 6PGD. En outre, si on ajoute des concentrations plus faibles de nicotinamide entre $10^{-2}$ et $10^{-5}$ M, on note une inhibition de l'enzyme proportionnellement à la quantité de nicotinamide ajouté. Ces auteurs ont obtenu le même effet en utilisant la NADPase de Neurospora Crassa. Il s'agissait alors d'isoler ce composé : par chromatographie des produits de la réaction NADPase + NADP sur colonne de DEAE-Sephadex A 25, ils isolèrent un pic se trouvant à un $R_f$ compris entre la nicotinamide et le NADP. Ce composé se révéla être le 2'-phospho-adénosine-phospho-ribose. On pouvait donc écrire la réaction :




2'-phospho-adénosine-phospho-ribose + 6PGD ⟶ 6PGD modifié.

Cette action indirecte de la NADPase sur la 6PGD, contraste avec le mécanisme direct d'inactivation de la G6PD par la NADPase du stroma qui détruit le NADP nécessaire à la stabilité de l'enzyme. Le fait d'ajouter dans un hémolysat du phospho-adénosine-phospho-ribose, ne modifie donc en rien l'activité de la G6PD.

VARIANTES ÉLECTROPHORÉTIQUES.

C'est à l'école de Londres et en particulier aux Professeurs PARR et FITCH (175) que revient le mérite d'avoir étudié les propriétés électrophorétiques de la 6PGD. Depuis 1964 ils (176) ont décrits huit variétés enzymatiques différentes parmi une population londonienne de 4.558 habitants.

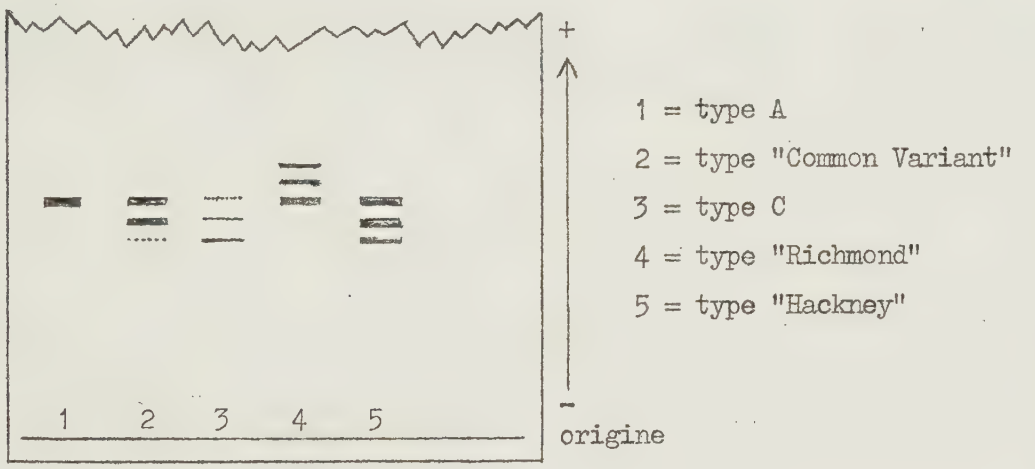



Fig. 15 - Tracés électrophorétiques des isozymes de la 6-phosphogluconate-déshydrogénase (d'après PARR et FILDES (176)).

- type A : il existe à raison de 95,68 p.cent. Il apparaît à l'électrophorèse sous la forme d'une seule bande bien visible migrant à environ deux centimètres de la ligne de départ en direction de l'anode. L'activité enzymatique est de 100 p.cent. Cependant ces auteurs ont décrit chez 1 p. cent des individus A deux variétés migrant comme A mais d' activité différente. C'est pourquoi le type A normal est dénommé "Usual type", le type A ayant 50 p.cent d'activité est désigné par "Ilford type", et celui ayant 75 p.cent d'activité est décrit sous le nom de "Dalston type".

- type "Common Variant" : il existe à raison de 4,12 p. cent. Il est défini par trois bandes : une bande a identique à celle du type A, une bande b ayant la même intensité que a, et une bande c plus lente que les deux précédentes apparaissant avec moins d'intensité. L'activité est de 90 ± 10 p.cent.

- type C : il existe à raison de 0,09 p.cent. Sa dénomination vient du fait qu'il est défini par une bande c à l'électrophorèse; cette bande c migre lentement et reste donc près de la cathode.

Ce type se subdivise en "Canning type" ayant 79 ± 8 p. cent d'activité et en "Newham type" ayant 50 p.cent d'activité.

Il existe enfin trois autres variantes d'une extrême rareté décrites chez deux individus seulement. Il s'agit du

- "Richmond type, constitué d'un triplet dont la bande la plus lente se confond avec a . L'activité est de 100 p.cent.

- "Hackney type" : il s'agit aussi d'un triplet, mais cette fois c'est la bande la plus rapide qui est identique à a . L'activité est aussi de 100 p.cent. Comme dans le cas précédent, la bande centrale est celle qui apparaît avec la plus grande intensité.

- "Whitechapel variant" : elle fut découverte par hasard chez un sujet londonien. Son activité est de 0 p.cent et elle ne donne aucun tracé à l'électrophorèse.

D'après ces études, la 6PGD apparaît donc sous la forme d'un dimère. Les sujets de type A et de type C sont des homozygotes puisqu'ils ne possèdent qu'un seul type de gène a ou c . Les individus ayant le type "Common variant" sont des hétérozygotes puisqu'ils possèdent les composants a + b + c . Les génotypes s'écrivent donc pour le "Usual type" $PGD^{\alpha}$ $PGD^{\alpha}$ pour le "Canning variant" $PGD^{\beta}$ $PGD^{\beta}$ et pour le "Common variant" $PGD^{\alpha}$ $PGD^{\beta}$ , quant aux individus possédant le "Richmond type" et le "Hackney type" ce sont aussi des hétérozygotes et ils s'écrivent $PGD^{\alpha}$ $PGD^{\delta}$ pour le premier, $PGD^{\alpha}PGD^{\delta}$ pour le second. L'apparition d'une bande pour le sujet homozygote et de trois bandes pour le sujet hétérozygote s'explique ainsi : les gènes allèles de la 6PGD donnent naissance à des sous-unités qui se combinent deux à deux pour former un enzyme actif. Ainsi le type Richmond possédant le génotype $PGD^{\alpha}$ $PGD^{\delta}$ synthétise les sous-unités $S^{\alpha}$ et $S^{\delta}$ qui formeront les dimères $S^{\alpha}S^{\alpha}$ correspondant à la bande a , $S^{\alpha}S^{\delta}$ correspondant à la bande intermédiaire et $S^{\delta}S^{\delta}$ correspondant à la bande la plus rapide. De plus, si on suppose que la quantité de sous-unités produite par les différents allèles est la même, et que ces sous-unités se combinent entre elles d'une certaine manière pour former des dimères ayant la même activité spécifique, on peut donc affirmer que la bande centrale du triplet est la plus intense avec une activité de 50 p.cent du total et que les deux bandes disposées symétriquement de part et d'autre de la bande centrale posséderont chacune 25 p.cent de l'activité totale.

L'application des propriétés électrophorétiques a été particulièrement intéressante dans les recherches de l'anthropologie humaine. Le tableau X donne la fréquence du gène allèle $PGD\beta$ à travers le monde. Il est frappant de constater que celui-ci est particulièrement répandu à travers le continent africain.

Tableau X

Répartition géographique de l'allèle PGD$^{\beta}$ de la 6-phosphogluconate-déshydrogénase

(d'après CARTER, FILDES, FITCH, PARR (176))

| Localisation géographique | Sujets étudiés | " Common Variants " génotype PGD$^{\alpha}$ PGD$^{\beta}$ | " Type C " génotype PGD$^{\beta}$ PGD$^{\beta}$ | Fréquence de l'allèle PGD$^{\beta}$ en p.cent |
|---|---|---|---|---|
| Londres | 4 558 | 188 | 3 | 2,1 |
| Tororo - Uganda | 109 | 12 | 0 | 5,6 |
| Ibadan - Nigéria | 100 | 12 | 0 | 6,0 |
| Porto-Alègre Brésil | 35 | 3 | 0 | 4,3 |
| Athènes | 128 | 10 | 0 | 3,9 |
| Juifs Habbanites en Israël | 499 | 66 | 4 | 7,4 |
| Bhutan | 95 | 39 | 4 | 24,7 |
| Noirs des Etats-Unis | 296 | 18 | 0 | 3,0 |
| Caucasiens aux Etats-Unis | 58 | 1 | 0 | 0,9 |
| Yucatan - Mexique | 85 | 0 | 0 | 0 |
| Blancs d'Afrique du Sud | 200 | 13 | 0 | 3,2 |
| Gens de couleurs en Afrique du Sud | 200 | 18 | 0 | 4,5 |
| Malaysiens d'Afrique du Sud | 100 | 5 | 0 | 2,6 |
| Bantous d'Afrique du Sud | 200 | 53 | 4 | 15,2 |

## Chapitre XIV

## ADÉNOSINE-TRIPHOSPHATASE

En 1964, les auteurs danois, HARVALD,HANEL et coll.(177), rapportaient pour la première fois chez trois familles différentes, l'existence d'un déficit en ATPase $Na^+$ et $K^+$ dépendante. Le premier malade avait une anémie hémolytique héréditaire transmise comme un caractère dominant et le taux d'ATPase chez son père était bas. Le second malade avait un syndrome d'hypertension portale avec hémorragies digestives; une de ses soeurs, légèrement anémique,avait un taux bas d'ATPase, mais le père et la mère avaient des taux normaux. Le troisième sujet avait eu deux poussées de subictère et n'avait pas d'antécédents familiaux de type hémolytique. Les auteurs concluaient de ces trois cas, qu'un déficit en ATPase, vraisemblablement transmis comme un caractère dominant, était responsable d'anémies hémolytiques congénitales et que l'incidence de la tare devait être élevée, puisqu'ils avaient découvert trois cas en moins d'un an. Un quatrième cas a été décrit en 1968 par COTTE et coll.(178) chez un enfant de deux ans ayant une anémie hémolytique certaine avec ictère, splénomégalie et forte réticulocytose. Le déficit n'a pas été retrouvé chez les parents, ni dans la fratrie, aussi ces auteurs ne peuvent-ils apporter aucun élément sur le mode de transmission de ce déficit enzymatique. A l'opposé, MIRCEVOVA (179) rapporte une importante augmentation de l'activité ATPasique chez les sujets atteints de sphérocytose.

Le rôle de l'ATPase dans le globule rouge est avant tout un rôle de transporteur d'ions $Na^+$ et $K^+$ à travers le stroma. Le potassium s'y trouve à un taux élevé de l'ordre de 100 milliéquivalents par litre à l'intérieur du sac érythrocytaire, alors que le sodium y est à un taux bas d'environ 25 milliéquivalents par litre. L'énergie réclamée pour maintenir ce gradient de concentration est apportée par l'ATPase qui serait aussi nécessaire, voire indispensable pour le maintien de la forme même du globule. Il y aurait donc bien production d'énergie, mais cette dernière ne serait pas utilisée à son maximum pour le maintien de la concentration ionique cellulaire (figure 16). Dans la maladie de Minkowski Chauffard, il y aurait une mauvaise utilisation d'énergie à cause du déficit d'un enzyme, l'ATPase, mais besoin accru d'énergie à cause d'un défaut de la membrane, dans le but de maintenir ce gradient $Na^+$-$K^+$ de la cellule et éviter ainsi le gonflement osmotique, puis la lyse.

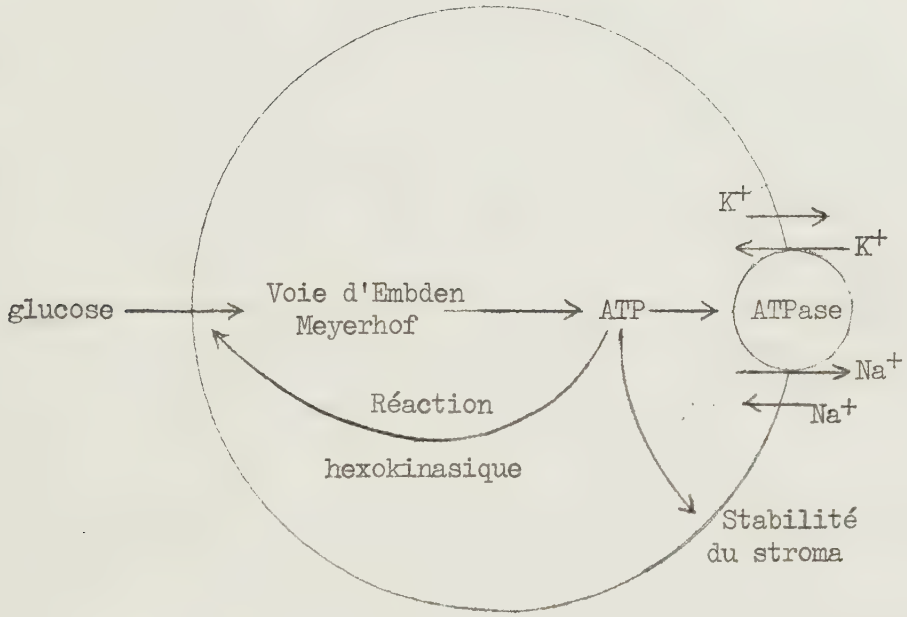



Fig. 16 - Mécanismes énergétiques dans le globule rouge (d'après NATHAN, OSKI, coll.).

La première démonstration concernant l'existence d'un enzyme présidant au transport actif des ions $Na^+$ et $K^+$ est due à SKOU (180) en 1957. Cet auteur travaillait alors sur des neurones de crabes. En 1960, POST et coll.(181), rapportent l'existence dans les érythrocytes de mammifères de deux variétés d'ATPase, localisées toutes deux dans le stroma globulaire. L'une d'elle est activée par le $Na^+$ et le $K^+$, se trouve totalement inhibée par les glucosides cardiotoniques tels l'oubaïne et est dénommée "sensitive ATPase" par BREWER et coll.(182). Cet enzyme utilise l'ATP comme source d'énergie et veille au maintien du gradient de concentration en $Na^+$ et en $K^+$ de la cellule. L'autre dénommée "insensitive ATPase" ne nécessite pas la présence de $Na^+$ et de $K^+$, est insensible à l'action de l'ouabaïne et ne préside pas au transport du $Na^+$ et du $K^+$. Par contre, les deux enzymes sont activés par les ions $Mg^{++}$ et tous deux détachent de l'ATP un groupement phosphate. SEN et POST (183) ont mis en évidence les relations stoéchiométriques existant entre la sortie du $Na^+$ et l'entrée du $K^+$ dans le globule rouge d'une part, et entre l'hydrolyse du Mg-ATP en Mg-ADP avec libération d'un phosphate inorganique d'autre part. Ainsi que le montre la figure 17, 2 $K^+$ pénètrent dans la cellule en même temps que 3 $Na^+$ en sortent.

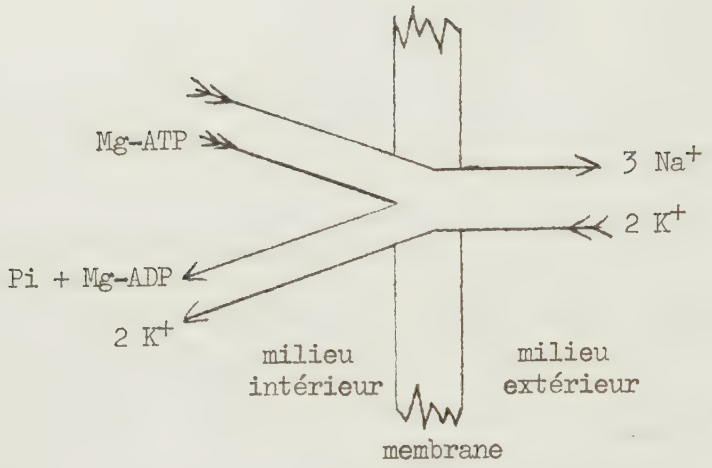



Fig. 17 - Stoéchiométrie du transport actif des ions dans le globule rouge (d'après SEN et POST).

Ce phénomène consomme une molécule d'ATP. L'inhibition de ce transport actif par l'ouabaïne entraîne l'accumulation intracellulaire de sodium avec fuite du potassium. L'inhibition de la glycolyse détermine une baisse de l'ATP, entraînant l'arrêt du transport actif des cations à travers la membrane. Il s'en suit une fuite du $K^+$ des hématies, alors que le $Na^+$ y pénètre massivement. Il passe normalement une faible quantité d'ions à travers le stroma de l'ordre de 1,5 à 2 milliéquivalents par litre d'érythrocytes et par heure. En présence d'un inhibiteur de la glycolyse tels les métaux lourds, le fluorure de sodium ou l'iodoacétate associé aux nucléosides puriques, GARDOS et coll.(184) ont observé une fuite du potassium de l'ordre de 5 à 20 milliéquivalents par litre d'érythrocytes et par heure. Cette sortie du $K^+$ n'est pas compensée par la pénétration du $Na^+$ dans le globule, mais par une rentrée massive d'ions $H^+$ entraînant une diminution du volume érythrocytaire mise en évidence par la baisse de l'hématocrite. Cet échange entre les ions $H^+$ et $K^+$ est fortement augmenté en présence de composés azotés notamment le chlorure d'ammonium, l'hydrazine, l'histidine et surtout l'histamine. Si ce dernier composé agit sur le $K^+$, il n'a par contre aucun effet sur le passage des ions $Na^+$, et il n'affecte nullement le transport actif si le taux d'ATP et la glycolyse sont normaux. Ce phénomène est tributaire des ions $Ca^{++}$ ainsi que du $NADH_2$. A l'inverse, des chélateurs tels l'EDTA bloquent complètement la fuite du $K^+$. Le calcium formerait un complexe avec les protéines et les phospholipides de la membrane. L'absence de cet ion produit donc une perturbation dans la structure du stroma conduisant à l'altération de sa perméabilité. Inversement le transport des ions sera considérablement diminué en présence d'antihistaminiques.

L'existence de l'ATPase ayant été défini avec certitude et décrite comme étant la "pompe à sodium", MARCHESI et PALADE (185), dans une étude récente, ont essayé de localiser l'enzyme dans le globule rouge. Grâce à des méthodes cytochimiques et avec l'aide du microscope électronique, ils ont situé l'enzyme au niveau du stroma appelé par les anglo-saxons "red cell ghosts". Ces "ghosts" apparaissent comme des sacs vidés de leur contenu et formés par une membrane continue, tapissée à sa face interne par de fins filaments dont on ne connaît encore ni le rôle, ni la structure. Utilisant la technique de WACHSTEIN et MEISEL (186), ils situent les précipités de la Mg-ATPase ainsi que de la Na-K-ATPase soit collés le long de la face interne du stroma, soit au contact de ces formations filamenteuses, distantes de 300 Angströms environ de la membrane. Mais en aucun cas, ils ne trouvaient l'enzyme sur la face externe du globule. Plus récemment, MASIAK et GREEN (187) ont essayé de savoir si les sites actifs de liaison du $Na^+$ et du $K^+$ étaient uniques ou bien s'il s'agit de deux sites distincts. De même, ces auteurs ont tenté de définir s'il existait une relation entre les sites de liaison de la Mg-ATP et les cations $Na^+$ et $K^+$. Ils mettent à profit l'action d'enzymes protéolytiques sur les stromas érythrocytaires. C'est ainsi que la trypsine affecte le site du $Na^+$, mais laisse intact celui de la Mg-ATP. On peut donc penser à l'existence de deux sites différents. De même l'$\alpha$-chymotrypsine détruit le site du $K^+$, sans toucher celui de la Mg-ATP. On peut donc en déduire que le composé phosphorylé n'est pas détruit par les protéases. A la lumière de ces résultats, il apparaît par conséquent, que les sites de liaison du $Na^+$ et du $K^+$ sont bien distincts. Cependant il serait possible que le même site présente deux configurations : l'une sensible à la trypsine quand le $Na^+$ y est fixé, et l'autre insensible à la trypsine mais sensible à l'$\alpha$-chymotrypsine quand le $K^+$ y est fixé. C'est pourquoi il n'est pas possible à l'heure actuelle de savoir avec certitude si les ions $Na^+$ et $K^+$ se fixent à des endroits différents du stroma.

Après avoir déterminé le rôle et l'action joué par l'ATPase dans le globule rouge, il convient d'en étudier les caractères physico-chimiques. On sait à présent que le bon fonctionnement de l'ATPase est tributaire des ions $Na^+$ et $K^+$. En l'absence d'ATP, la rétention du $Na^+$ est identique à celle du $K^+$; par contre, en présence d'ATP, la rétention du $Na^+$ est de loin supérieure à celle du $K^+$. Le $K^+$ a donc une action potentialisatrice, mais il n'a pas d'effet compétitif. Depuis WHITTAM et AGER (188), on sait que le $K^+$ peut être remplacé par d'autres cations monovalents. C'est ainsi que le $Rb^+$ a la même action que le $K^+$, alors que le $Cs^+$ et le $Li^+$ activent cette rétention, mais à un degré moindre. A l'inverse, les cations divalents tels le $Zn^{++}$ et le $Pb^{++}$ inhibent l'ATPase de 50 p.cent, par contre les sels de $Ba^{++}$ et de $Ni^{++}$ n'ont aucune action. WALZ et CHAN (189) ont étudié l'action

de la cystéine. Cet amino-acide, grâce à son groupement sulfhydryle, représente un agent protecteur vis-à-vis du transport actif des ions. Il n'agirait pas directement sur l'ATPase,mais aurait une action sur la structure et la stabilité du stroma. En l'absence de cystéine,la rétention du $Na^+$ est bloquée et cet acide aminé stimule l'ATPase en l'absence de $Na^+$ et de $K^+$. Les auteurs ont essayé de savoir quelle partie de la molécule était responsable de cette activation : ils trouvent que la D-cystéine et la L-cystéine ont la même action, alors que la N-acétyl-cystéine et la cystéine-éthyl-ester provoquent une stimulation de 40 p.cent seulement par rapport à la cystéine. Ceci montre bien que les groupements aminé et carboxyle terminaux sont nécessaires pour assurer une activité optimale. Ce phénomène est facilement mis en évidence par l'utilisation du glutathion qui n'a aucun effet sur la rétention du $Na^+$. Le second caractère de la molécule assurant l'activation de l'enzyme est dû au fait que la cystéine possède un groupement sulfhydryl libre. Si on remplace en effet la cystéine par de la S-méthyl-cystéine ou de la sérine, cette activation n'a plus lieu. L'effet de la cystéine sur l'ATPase a donc été l'objet de nombreuses études, ainsi qu'en témoignent les résultats résumés dans le tableau XI. Les auteurs comparent l'activité de l'ATPase dans des mélanges d'incubation en présence et en l'absence de cystéine. L'expérience 1 montre que la stimulation de l'activité ATPasique due à la cystéine est de 77 p.cent en l'absence de $Na^+$ et de $K^+$, alors qu'elle n'est que de 10 p.cent en présence de ces ions. L'activation est donc nettement supérieure en l'absence de $Na^+$ et de $K^+$. L'expérience 2 avait pour but de déterminer si la cystéine associée au $Na^+$ pouvait remplacer le $K^+$ dans l'activation enzymatique. En accord avec les résultats précédemment publiés, les auteurs confirment que l'ATPase est activée par les ions $Na^+$ et $K^+$ et inhibée par l'ouabaïne. Lorsqu'on substitue 25 mM de cystéine au $K^+$, l'addition soit de $Na^+$ seul, soit de $Na^+$ associé à l'ouabaïne, n'a pas d'effet sur l'activité ATPasique. Les résultats nous montrent donc clairement que les mécanismes d'action de la cystéine et du $K^+$ vis-à-vis de l'ATPase sont totalement différents et qu'on ne peut donc substituer indifféremment l'un de ces composés à l'autre.

Tableau XI

Action de la cystéine sur l'ATPase (d'après WALZ et CHAN (189)).

| Expérience | L-cystéine (mM) | Additions | ATPase (mμ moles Pi par mg de protéine et par heure) |
|---|---|---|---|
| 1 | 6 | - | 237 |
| | 6 | $Na^+$, $K^+$ | 567 |
| | 6 | $Na^+$, $K^+$, ouabaïne | 234 |
| | 0 | - | 134 |
| | 0 | $Na^+$, $K^+$ | 434 |
| | 0 | $Na^+$, $K^+$, ouabaïne | 160 |
| 2 | 0 | - | 65 |
| | 0 | $Na^+$, $K^+$ | 183 |
| | 0 | $Na^+$, $K^+$, ouabaïne | 83 |
| | 25 | - | 112 |
| | 25 | $Na^+$, $K^+$ | 110 |
| | 25 | $Na^+$, $K^+$, ouabaïne | 109 |

MATSUI et SCHWARTZ (190) ont essayé de déterminer le mécanisme exact d'inhibition de l'ATPase par les glucosides cardiotoniques tels que la digoxine ou l'ouabaïne. Cette inhibition est due à la formation d'une liaison chimique entre l'enzyme et le glucoside, ainsi que le montre la figure 18.

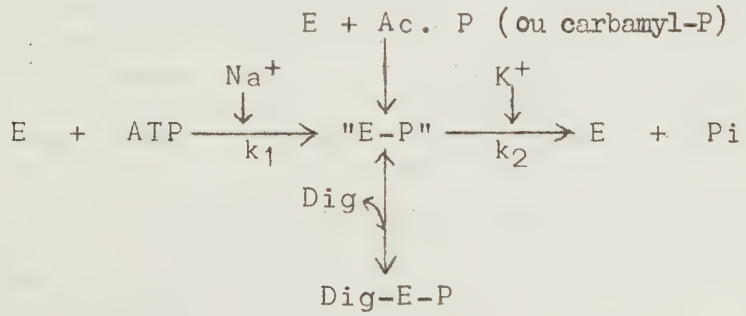



Fig. 18 - Mécanisme d'inhibition de la Na-K-ATPase par un glucoside cardiotonique (d'après MATSUI et SCHWARTZ).

Cette liaison demande la présence d'ATP et de $Mg^{++}$; elle est inhibée par le $K^+$ et activée par le $Na^+$ ce qui prouve que la digoxine ne peut se lier à l'enzyme libre. Avant de devenir réactionnels, l'enzyme et le glucoside nécessitent donc la présence d'ATP et de $Mg^{++}$. Cette liaison enzyme-digoxine peut aussi être réalisée en présence d'acylphosphate. Dans ce cas le $Na^+$ n'a pas d'effet activateur, alors que le $K^+$ provoque toujours une inhibition. En conclusion, le glucoside cardiotonique ne se lierait à l'enzyme qu'après la formation d'un intermédiaire phosphorylé du type "E-P". Le $Na^+$ aurait pour rôle d'accélérer la formation de cet intermédiaire "E-P", alors que le $K^+$ favoriserait sa dissociation. Le site de liaison du glucoside paraît être différent de ceux du $Na^+$ ou du $K^+$. Ainsi, afin d'expliquer ce mécanisme d'inhibition, il faut admettre l'existence d'un composé "Dig . E-P" stable. Il apparaît donc que le glucoside cardiotonique se comporte comme un inhibiteur allostérique induisant un effet stabilisateur vis-à-vis d'une forme intermédiaire de l'enzyme.

MIRCEVOVA et SIMONOVA (191) ont décrit l'action de certains sucres sur l'activité ATPasique des stromas érythrocytaires. D'après PONDER (192), une partie des sucres n'est présente dans la paroi du globule rouge que pendant un temps assez bref, correspondant à leur passage à travers la membrane. Ces sucres sont alors pour la plupart fixés à un transporteur. L'autre partie forme des composés complexes propres à la structure du stroma dont les plus importants sont représentés par les groupes sanguins. PALEK et coll.(193) ont remarqué que la liaison d'un anticorps ant-A avec une substance de groupe A provoquait une augmentation de l'activité ATPasique, ce qui laisse supposer qu'il existe une certaine relation entre les sucres et l'activité enzymatique. MIRCEVOVA et coll.(191) travaillent avec des stromas traités par la saponine. Leurs expériences montrent que le galactose, la glucosamine et l'héparine, inhibent l'ATPase; cependant à faible concentration la glucosamine et l'héparine stimulent légèrement l'enzyme. La glucosamine et l'héparine influencent aussi bien l'ATPase $Mg^{++}$ que $Mg^{++}$, $Na^+$, $K^+$ dépendante. Par contre, en opérant sur des globules intacts non traités, le glucose, le galactose et la glucosamine, activent légèrement l'enzyme. Enfin, le sucrose et le dextrane n'ont aucune action sur l'ATPase.

L'action des détergents a été longuement étudiée par MARCHESI et PALADE (185). L'utilisation des composés tensio-actifs modifie l'activité de l'ATPase dans les différentes préparations effectuées à partir de membranes biologiques. SKOU (194) rapporte que l'activité de la Na-K-ATPase des microsomes de neurones peut être sensiblement augmentée par l'utilisation du désoxycholate. En traitant les stromas par différentes concentrations de détergents anioniques tel le dodécyl sulfate de sodium, ou cationiques tel le chlorure de cétylpyridinium ou plus simplement la saponine ou la digitonine, ceux-ci montrent les

mêmes propriétés à savoir une extériorisation très nette de l'activité enzymatique. Cependant cette activation ne se fait qu'à une faible concentration en détergents, car des concentrations trop importantes amènent l'inhibition totale de l'enzyme. L'addition de dodécyl sulfate à un milieu contenant du $Pb^{++}$ diminue l'inhibition de ce métal vis-à-vis de l'ATPase.

Dans une étude plus récente, MIRCEVOVA et coll.(195) ont étudié l'influence des hémolysines sur l'activité de l'ATPase et sur la composition de la membrane érythrocytaire. C'est ainsi que la lysolécithine stimule l'activité de la Mg et de la Mg-Na-K-ATPase. Par contre, la lécithine n'active l'enzyme que dans les hématies traitées par la saponine. Après incubation des stromas en présence de saponine ou de digitonine à des concentrations activant l'ATPase, les auteurs éluent une plus faible quantité de phospholipides qu'après traitement de ces mêmes stromas en présence d'eau. La saponine ne modifie pas grandement le taux de cholestérol libre, contrairement à la digitonine. Quant aux esters du cholestérol, leur taux reste inchangé. L'étude des protéines du stroma en présence de saponine, de digitonine, de lysolécithine et de lécithine a apporté des résultats analogues. Une chute du taux des protéines était notée après traitement des stromas par la saponine et la digitonine en soluté physiologique.

Quelles sont à présent les modifications causées par les hémolysines vis-à-vis de la membrane du globule rouge ? Après traitement par la saponine, la structure du stroma est altérée ainsi que le prouve l'apparition d'orifices de forme hexagonale; d'après BANGHAM et coll.(196), ces désordres seraient dus à la formation d'un complexe entre la saponine et le cholestérol. Ces résultats ont été confirmés par la diffraction aux rayons X; il en est de même pour la digitonine. Le cholestérol intervient dans la stabilité et dans la structure des stromas. C'est pourquoi la formation d'un complexe renfermant le cholestérol entraîne des modifications dans la structure des parois érythrocytaires. L'action de la lysolécithine est beaucoup moins bien connue. KLIBANSKY (197) ne relève pas d'altérations quantitatives des phospholipides. Cet auteur émet trois hypothèses : une interaction avec la lécithine, la formation d'un complexe avec le cholestérol et l'interaction avec certains composés non lipidiques, vraisemblablement des protéines. Toutes les hémolysines influencent par conséquent l'activité de l'ATPase, quoique de manière différente. Après traitement par la digitonine, seule la Mg-ATPase est activée, alors qu'après traitement par la lysolécithine et la saponine, aussi bien la Mg-ATPase que la Mg-Na-K-ATPase sont activées. L'augmentation de l'activité ATPasique n'est pas due à un changement de structure des protéines ou à une variation du taux de cholestérol, mais à la modification des composés lipidiques du stroma. La modification de l'aspect des hématies après traitement par les hémolysines, peut aussi être expliqué par des changements in-

tervenant dans la structure lipidique, ainsi que dans la composition des protéines contractiles de la membrane. Le bouleversement des lipides où le cholestérol joue un rôle important, peut être accompagné par la rupture de certains ponts; de même la modification du rapport lysolécithine-lécithine peut influencer la forme du globule rouge. C'est ainsi que la lysolécithine se présente sous un aspect fibrillaire, alors que la lécithine forme de grandes micelles discoïdes. Si dans le rapport la lécithine augmente, il apparaîtra une forme discoïde biconcave, alors que si la lysolécithine augmente, le globule rouge prendra une forme sphérique, telle qu'on peut la voir dans la spérocytose constitutionnelle. La relation existant entre la forme de l'érythrocyte et les protéines contractiles n'est encore qu'hypothétique. D'après les travaux d'OHNISHI (198), l'érythromyosine et l'érythroactine des stromas sont identiques à la myosine et à l'actine des muscles. C'est pourquoi l'actomyosine des stromas possèderait aussi des propriétés contractiles et la protéine contractile du muscle serait analogue à l'ATPase.

Nos connaissances concernant l'ATPase sont encore bien fragmentaires, et il n'est pas possible de dire à l'heure actuelle avec certitude, si une modification de l'activité ATPasique est elle-même la cause des transformations morphologiques du globule rouge ou bien s'il s'agit de deux phénomènes simultanés concernant aussi bien l'ATPase que les constituants lipidiques des hématies.

## Chapitre XV

## NICOTINAMIDE-ADÉNINE-NUCLÉOTIDE-NUCLÉOSIDASE

La première démonstration concernant un déficit en NADase a été rapportée en 1968 par WON G. NG, GEORGE N. DONNELL et W. R. BERGREEN (199) chez deux familles américaines de race noire. Ces mêmes auteurs ont montré que les hémolysats de nouveaux-nés étaient différents de ceux de sujets adultes par le fait que l'UDP-galactose-4-épimérase est activée en l'absence de NAD d'origine exogène. L'activité de l'épimérase NAD-indépendante était donc la conséquence d'une activité faible ou nulle de la NADase dans les hémolysats de nourrissons. Parmi un groupe d'échantillons à tester, l'activité de cette épimérase fut retrouvée dans l'hémolysat d'un seul sujet de race noire. L'activité de la NADase manquait dans ces globules rouges. Une étude plus approfondie a montré que l'activité faible, voire nulle de la NADase était fréquente parmi ces sujets, alors qu'elle était normale chez les sujets de race blanche.

Dans la famille du premier sujet étudié, les valeurs de la NADase étaient pratiquement nulles chez la mère et chez trois tantes maternelles. La demi-soeur était hétérozygote. Dans la deuxième famille, la NADase montrait une activité pratiquement nulle chez la propositus ainsi que chez son père; quant à la mère et au frère, ils étaient hétérozygotes.

Le rôle et la fonction de la NADase dans le globule rouge ne sont que très peu connus à l'heure actuelle, et on se borne encore à des constatations très sommaires sans en donner d'interprétation. Ainsi chez le nouveau-né de race blanche, l'activité de la NADase est faible ou nulle, mais le taux de l'adulte est atteint au cours de la première année de la vie, contrairement à ce qui se passe dans la race noire. Chez ces derniers sujets, il est souvent difficile de conclure avec certitude à un déficit et les cas décrits sont sujet à discussion.

ALIVISATOS et coll.(200) ont étudié les propriétés de l'enzyme. Celui-ci est particulièrement stable, puisque son activité reste inchangée pour un pH compris entre 4,5 et 10. La NADase détache aussi la nicotinamide du NADP, mais son affinité pour ce dernier composé n'est que le tiers de celui du NAD. Comme l'ATPase, cet enzyme est localisé dans le stroma du globule rouge. La nicotinamide, l'adénine et l'adénosine, les phosphates et les pyrophosphates, les dérivés substitués de la purine tels la théobromine, la théophylline, le benzimidazole, les dérivés de la pyrimidine tels la xanthine, la thymine, l'uracile, inhibent l'action de la NADase. Par contre, des composés tels le ribose, l'acide adénylique, la caféine, le nembutal, le barbital et l'alloxane, sont sans action.

# D E U X I E M E  P A R T I E

## RECHERCHES PERSONNELLES

---

## A - TECHNIQUES DE DOSAGE DES ENZYMES DU GLOBULE ROUGE

# INTRODUCTION

Les techniques spectrophotométriques de déterminations des activités enzymatiques, reposent sur le principe du test optique de WARBURG, développé par BÜCHER, BERGMEYER et de nombreux auteurs. L'activité catalytique de l'enzyme est mesurée dans les conditions optimales, définies pour toute mesure enzymatique (pH, température, force ionique, concentrations en substrats, cosubstrats, coenzymes et effecteurs) par la détermination de la vitesse d'oxydation ou de réduction d'un coenzyme à pyridine-nucléotide.

$$NAD^+ + 2\,H \rightleftharpoons NADH + H^+$$

$$\text{ou } NADP^+ + 2\,H \rightleftharpoons NADPH + H^+$$

Ces deux coenzymes possèdent à l'état réduit une bande d'absorption caractéristique dans le proche ultra-violet à 340 nm, bande qui disparaît à l'état oxydé. Il est donc possible de suivre quantitativement la réaction catalysée par l'enzyme et de mesurer la vitesse de cette réaction à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur la longueur d'onde de 340 nm. Pour cela, il faut que la réaction soit une réaction d'oxydation ou de réduction, catalysée par une déshydrogénase à NAD ou NADP.

Exemples :

- la lactico-déshydrogénase :

$$\text{pyruvate} + NADH_2 \rightleftharpoons \text{lactate} + NAD$$

- la glucose-6-phosphate-déshydrogénase :

$$\text{glucose-6-phosphate} + NADPH_2 \rightleftharpoons \text{6-phosphogluconate} + NADP.$$

Le produit d'une réaction enzymatique n'utilisant pas ces coenzymes peut aussi être dosé par une déshydrogénase ajoutée en excès dans le milieu. On emploie un couplage de deux ou trois réactions, toutes enzymatiques, dont l'une utilise le NAD ou le NADP.

Exemples :

- détermination de l'aldolase en présence de triose-phosphate-isomérase et de glycérophosphate-déshydrogénase.
- détermination de la pyruvate-kinase en présence de lactico-déshydrogénase.

Les enzymes ajoutés pour catalyser les réactions secondaires doivent se trouver en excès dans le milieu; ils ne doivent en aucun cas catalyser des réactions parasites; enfin, ils doivent catalyser la réaction dans un sens tel que le produit à doser sera immédiatement détruit, c'est-à-dire que la Constante de Michaëlis de la déshydrogénase employée pour la réaction finale, doit être basse vis-à-vis du substrat considéré.

En corollaire de ces méthodes, il est évident que l'emploi des tests spectrophotométriques de dosage des activités enzymatiques est extrêmement étendu, il permet un nombre considérable de déterminations et peut s'étendre aux évaluations non seulement d'enzymes, mais encore de substrats et même de coenzymes. Les tests spectrophotométriques sont pour le biochimiste des méthodes particulièrement sensibles, rapides et adaptées à ses problèmes, à condition de respecter quelques principes simples et surtout d'utiliser des substrats et des préparations enzymatiques bien définis.

Les réactifs utilisés consistent en solutions de substrats, de coenzymes, de tampons et en suspensions d'enzymes. Un certain nombre de firmes françaises et surtout étrangères, fabriquent des coffrets réactifs avec lesquels il suffit de dissoudre dans l'eau bidistillée le contenu du flacon pour obtenir le réactif. Citons les firmes Biotrol, Sigma, Calbiochem et Boehringer; ce sont les normes de cette dernière firme que nous indiquerons le plus souvent dans les fiches techniques qui suivront. On peut aussi préparer soi-même les réactifs à partir des préparations commerciales d'enzymes, de substrats ou de coenzymes.

Les solutions tampons, utilisées dans la plupart des réactions, sont calculées pour que leur pH soit au pH optimal de l'enzyme et que la force ionique soit comprise entre 0,1 et 0,25. Elles sont à base de phosphates, d'acétates, mais surtout de tris-hydroxyméthyl-aminométhane appelé TRIS ou de triéthanolamine appelé TEA. Le pH réalisé se situe en général autour du pH physiologique. Mais le choix du système tampon n'est pas indifférent, car certains inhibent la réaction enzymatique. Dans la solution tampon, on ajoute souvent des coenzymes indispensables à la réaction tel le magnésium, des inhibiteurs des réactions parasites comme le monoiodacétate, parfois on y dissout le substrat. Ces solutions se conservent bien à + 4°C. Les solutions de coenzymes sont préparées en dissolvant dans l'eau bidistillée ou mieux dans une solution de bicarbonate de sodium à 5 p.mille le sel de sodium du pyridine-nucléotide. En général la concentration de la solution est comprise entre 10 et 20 $\mu$g/ml. Ces solutions se conservent mal, même à froid. Les solutions de substrats sont définies pour qu'à la concentration choisie, on obtienne une vitesse de réaction optimale et surtout pour que cette vitesse soit proportionnelle à la concentration enzymatique (excès de substrat). Ces solutions seront aussi conservées au froid à + 4°C.

Les solutions d'enzymes sont fournies directement par les laboratoires qui les préparent à un degré de pureté suffisant. On les conserve au froid et la durée de leur conservation peut varier considérablement d'une préparation à l'autre.

Dans la plupart des cas, on utilisera un spectrophotomètre dans le proche ultra-violet, afin de mesurer avec précision la variation de densité optique au cours de la réduction du NAD ou NADP ou de l'oxydation du $NADH_2$ ou $NADPH_2$. Pour mesurer cette variation de densité optique, deux types de photomètres sont utilisés, d'une part les spectrophotomètres à spectre continu dans lesquels la lumière d'une lampe émettrice est dissociée par un prisme ou par un réseau (dispositif monochromateur), d'autre part les photomètres dont la lampe (mercure ou cadmium) fournit un spectre de raies, un filtre permettant de sélectionner la raie convenable. Les spectrophotomètres du premier type dosent les pyridine-nucléotides à 340 nm , mais nécessitent des cuves en quartz en général de 10 mm de trajet optique et de 4 ml de contenu, ceux du second type exploitent la raie du mercure à 366 nm , ce qui permet l'emploi de cuves ordinaires en verre. La chambre porte-cuve est munie d'un dispositif de thermostatation par circulation d'eau à + 25°C. En effet, cette température, pour des raisons de commodité, entre dans la définition de l'Unité Internationale. Une erreur de 1°C provoque dans la zone de 20 à 40°C, une variation de la vitesse de réaction moyenne de 12 p.cent par degré.

Les déterminations enzymatiques par les techniques spectrophotométriques présentent donc le grand avantage de la spécificité, de la rapidité et de la précision. Elles sont applicables à un nombre considérable d'évaluations, non seulement d'enzymes sériques ou tissulaires, mais aussi de substrats et de coenzymes et sont appelées à un développement et à un emploi en biochimie clinique toujours plus important.

## Chapitre I

## DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA G6PD ÉRYTHROCYTAIRE

L'enzymopathie par déficience en G6PD érythrocytaire a rapidement suscité un intérêt considérable, en raison de sa fréquence. De ce fait, un grand nombre de méthodes, plus ou moins spécifiques d'ailleurs, ont été proposées pour déterminer cet enzyme.

Dans cette étude, il nous faudra envisager trois catégories de techniques qui ont évolué en même temps que la connaissance du mécanisme intime de ce trouble biochimique.

### A. Méthodes qualitatives non spécifiques.

1°) Recherche des corps de Heinz :

L'incubation de globules rouges enzymopéniques en présence d'acétylphénylhydrazine provoque l'apparition de corps de Heinz volumineux dans plus de 40 p.cent des hématies.

2°) Diminution du taux de glutathion réduit :

Dans les hématies déficitaires le taux de glutathion réduit est diminué, conséquence du déficit en $NADPH_2$, lui-même secondaire au déficit en G6PD.

3°) Test de stabilité du glutathion réduit :

Il consiste à observer la diminution du taux de glutathion réduit sous l'effet de l'acétylphénylhydrazine. Alors qu'aucune diminution n'est observée dans les hématies normales, la variation est constamment importante dans les hématies déficitaires, le taux final étant 5 à 10 fois inférieur au taux initial.

4°) Epreuve de réversion de la méthémoglobine :

JAFFE (201) et BONSIGNORE (202) ont décelé une diminution de l'activité de la méthémoglobine-réductase à $NADPH_2$ dans les hémolysats de globules rouges déficients en G6PD.

Cette épreuve consiste à méthémoglobiniser totalement le globule rouge par le nitrite. Les hématies sont alors lavées, afin de les débarrasser de toute trace d'oxydant, puis incubées à 37°C en présence d'un substrat approprié. En présence de glucose ou d'inosine, seule la diaphorase à $NADH_2$ intervient, alors qu'en présence de glucose ou d'inosine plus un colorant tel le bleu de méthylène ou le bleu de Nil, c'est la méthémoglobine-réductase à $NADPH_2$ qui intervient, elle-même tributaire de la présence en G6PD.

Malheureusement toutes ces méthodes sont grossières et ne permettent pas de poser un diagnostic, car elles sont aussi positives au cours d'intoxications par des poisons méthémoglobinisants, au cours du déficit en glutathion réduit, en 6-phospho-gluconate-déshydrogénase, en glutathion-réductase ou en méthémoglobine-réductase à $NADPH_2$.

C'est pourquoi une nouvelle série de techniques est venue enrichir la découverte de cette tare et vue la fréquence de cette anomalie chez les sujets noirs américains et chez les populations méditerranéennes, ces méthodes servent avant tout au dépistage à grande échelle. Elles sont généralement de réalisation aisée, rapides, et décrites en France sous le nom de "tests colorés", mais beaucoup plus répandues dans les pays anglo-saxons où elles sont qualifiées de "Screening tests" et de "Spot tests".

5°) Tests colorés :

Ils ont pour principe la sensibilité de l'indicateur coloré au phénomène de réduction du NADP en $NADPH_2$ qui découle de l'action de la G6PD sur le glucose-6-phosphate.

Il faut citer :

- les tests pratiqués sur une goutte de sang capillaire :

• le "spot test" de FAIRBANKS et BEUTLER (203) appliqué à un sel de tétrazolium dont la réduction s'accompagne d'un virage au bleu.

• le test de MOTULSKY et CAMPBELL KRAUT (204) utilisant le bleu de crésyl brillant.

• le test d'OSKI et GROWNEY (205) utilisant le bleu de méthylène.

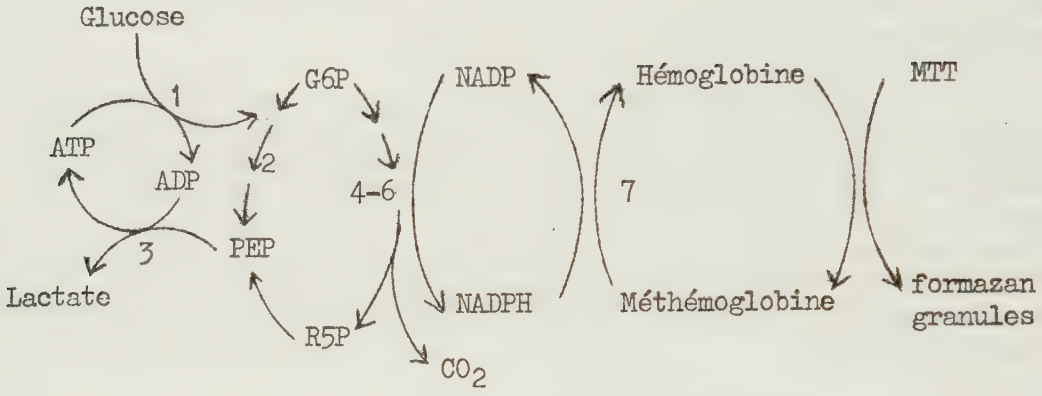
- les tests pratiqués sur sang veineux :

• le test de réduction de la méthémoglobine de BREWER (206).

• le test de JACOB et JANDL (207) utilisant l'acide ascorbique.

• le test de FAIRBANKS et LAMPE (208) utilisant un sel de tétrazolium (figure 19).

Test de FAIRBANKS et LAMPE :




1 = Hexokinase
2 = Enzymes de la voie d'Embden Meyerhof
3 = Pyruvate-kinase
4 = Lactonase
5 = G6PD
6 = 6PGD
7 = Méthémoglobine-réductase

ADP = adénosine-diphosphate
ATP = adénosine-triphosphate
G6P = glucose-6-phosphate
R5P = ribulose-5-phosphate
PEP = phospho-énol-pyruvate
MTT = sel de tétrazolium

Fig. 19 - Schéma biochimique de la réaction au bleu de tétrazolium dans le dépistage des déficits en glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

- les tests pratiqués sur une goutte de sang prélevée à la pulpe du doigt :

- D. MILLER et D. KOTTOK (209) décrivent récemment une technique basée sur celle de KNUTSEN et BREWER (210). On introduit une goutte de sang dans un tube capillaire renfermant de l'héparinate d'ammonium et du bleu de méthylène. Après trois heures d'incubation, on rejette la goutte sur du papier Whatman n° 1 et on compare la coloration obtenue à des témoins positifs et négatifs.
- le "screening test" de BERNSTEIN (211) dérive du test colorimétrique utilisant la phénazine-méthosulfate comme transporteur d'électrons entre le $NADPH_2$ et le 2,6-dichlorophénol-indophénol.

$$NADPH_2 + PMS \longrightarrow NADP + PMS \text{ réduit}$$

$$PMS \text{ réduit} + DPIP \text{ bleu} \longrightarrow PMS + DPIP \text{ réduit leucobase.}$$

B. Méthodes quantitatives non spécifiques.

Un dosage colorimétrique a été proposé par ELLS et KIRKMAN (212). Le méthosulfate de phénazine est employé comme transporteur d'hydrogène entre le $NADPH_2$ et le dichlorophénol-indophénol utilisé comme indicateur et dont le changement de couleur est comparé à un témoin.

C. Méthodes quantitatives spécifiques.

(technique personnelle)

PRINCIPE.

La glucose-6-phosphate-déshydrogénase catalyse la réaction :

glucose-6-phosphate + NADP $\rightleftharpoons$ 6-phospho-gluconate + $NADPH_2$.

L'équilibre se déplace dans le sens de la production de 6-phosphogluconate et de $NADPH_2$ en présence d'un excès de glucose-6-phosphate. La cinétique de cette transformation est mesurée par la variation de densité optique du coenzyme en lumière ultraviolette à 340 nm. à pH 7,4 et en présence du substrat, le glucose-6-phosphate. Elle est proportionnelle à l'activité de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

TECHNIQUE.

Elle dérive de celle décrite par W.H.ZINKHAM (213).

1°) Hémolyse des hématies :

On recueille 5 ml de sang sur héparine. Il est possible d'utiliser 1 mg d'héparine sodique ou 0,1 ml de soluté injectable d'héparine, car il est primordial de s'assurer que le soluté d'héparine ne contienne pas de phénol. On opère aussi tôt que possible après le prélèvement, au maximum dans les 24 heures qui le suivent.

Centrifuger le sang à 3 000 t/minute pendant 10 minutes et séparer le plasma surnageant. Laver trois fois les globules rouges en ajoutant chaque fois 2 à 3 ml d'eau physiologique. On décante à la pipette, montée sur trompe à vide, en entraînant la couche de globules blancs au dernier lavage. Eliminer aussi complètement que possible le liquide surnageant et mélanger pour homogénéiser la couche globulaire.

Dans un tube à hémolyse, diluer 0,2 ml de culot globulaire dans 3,8 ml d'eau bidistillée tamponnée à pH 7,6 par quelques gouttes de la solution tampon utilisée ultérieurement.

L'eau bidistillée est conservée à + 4°C. Agiter vigoureusement et laisser en contact 10 minutes à température du laboratoire pour s'assurer que l'hémolyse est complète. Centrifuger à 3000 t/minute pendant 10 minutes.

2°) Dosage de l'activité de la G6PD :

Dans une cuve de spectrophotomètre de 10 mm, introduire :

Solution tamponnée ..... 2,75 ml
Solution de coenzyme ..... 0,10 ml
Hémolysat ..... 0,10 ml

Mélanger et placer au thermostat à 25°C pendant quelques minutes. Placer la cuve dans l'appareil et régler la densité optique de la solution à 0,300 en jouant sur la largeur de la fente ou éventuellement sur la sensibilité, la longueur d'onde utilisée étant de 340 nm. Ajouter alors :

Solution de substrat ..... 0,05 ml

Agiter avec une baguette et réajuster au zéro en opérant sur la largeur de la fente. Faire démarrer le chronomètre et lire l'augmentation de la densité optique de minute en minute pendant 5 minutes et calculer l'augmentation moyenne de l'extinction par minute ( $E \cdot min^{-1}$ ).

3°) Détermination du microhématocrite sur le culot globulaire :

Introduire 1 ml de culot globulaire dans un tube de microhématocrite siliconé, fabriqué dans un tube capillaire de 6 cm de long et de 1,5 mm de diamètre interne. Centrifuger à grande vitesse pendant 20 minutes. L'hématocrite est compris entre 85 et 98 p.cent, lorsque la dernière décantation est effectuée correctement. On en tiendra compte dans les calculs ultérieurs.

RÉACTIFS.

On utilise le coffret Boehringer - Réf. T C-W n° 15 993.

1°) solution tamponnée :

Il s'agit d'une solution à la triéthanolamine 50 mM à pH 7,6 contenant 5 mM d'éthylène-diamine-tétraacétate de sodium. Dissoudre le contenu du flacon 1 du coffret Boehringer dans 100 ml d'eau bidistillée.

Le réactif se conserve un an à température du laboratoire.

2°) Solution de coenzyme :

Elle renferme 10 mM de NADP.

Dissoudre le contenu du flacon 2 du coffret Boehringer dans 2 ml d'eau bidistillée.

Le réactif se conserve 4 semaines à environ + 4°C.

3°) Solution de substrat :

Elle contient le glucose-6-phosphate à la concentration d'environ 30 mM et sous forme de sel de sodium.

Dissoudre le contenu du flacon 3 du coffret Boehringer dans 1,5 ml d'eau bidistillée.

Le réactif se conserve 4 semaines à + 4°C.

4°) Solution physiologique :

NaCl à 9 g par litre.

On n'utilise pas la solution 4 du coffret qui se compose d'une solution de digitonine à environ 0,02 p.cent.

CALCULS.

Les résultats sont exprimés en unités internationales, une unité (U) étant la quantité d'enzyme capable de transformer une micromole de substrat en une minute et à 25°C.

L'activité des globules rouges est évaluée en unités (U) par ml de culot globulaire.

Sachant que la densité optique d'une solution à 1 µM/ml de $NADPH_2$ est de 6,22 à 340 nm, le nombre de micromoles de $NADPH_2$ produites et donc de substrat consommé par minute à 25°C par ml de globules rouges, est en tenant compte des dilutions de :

$$\text{G6PD mU/ml} = \frac{\Delta E \cdot \text{min}^{-1}}{6,22} \times \frac{3}{0,1} \times \frac{4}{0,2} \times \frac{100}{Ht}$$

$$\text{G6PD mU/ml} = \frac{\Delta E \cdot \text{min}^{-1}}{2,07} \times \frac{1}{0,1} \times \frac{2}{0,1} \times \frac{100}{Ht}$$

$$= \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \times \frac{20}{2,07} \times 10 \times \frac{100}{Ht}$$

$$= \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \times \frac{100}{1,035} \times \frac{100}{Ht}$$

Si on opère à 366 nm le calcul devient :

$$\text{G6PD mU/ml} = \frac{\Delta E \cdot \text{min}^{-1}}{3,3} \times \frac{3}{0,1} \times \frac{4}{0,2} \times \frac{100}{Ht}$$

$$= \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \times \frac{100}{0,55} \times \frac{100}{Ht}$$

RÉSULTATS.

L'activité de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase est en moyenne de 1,50 UI/ml d'hématies avec des variations de plus ou moins 0,30 UI/ml. La nomenclature internationale tend à présent à se généraliser. Cependant il existe de nombreux autres modes d'expression, dont les valeurs empruntées à MAC DOUGALL (214) sont les suivantes :

G6PD U/100 ml d'hématies : 148 ± 9,12
G6PD U/g d'hémoglobine : 4,6 ± 0,32
G6PD U/$10^{10}$ globules rouges : 1,30 ± 0,09

Les chiffres donnés par LÖHR sont de 17,1 ± 2,3 UI/$10^{11}$ érythrocytes. Ces valeurs diffèrent nettement chez le jeune enfant, le nourrisson et sont très élevées chez le prématuré. Nous trouvons personnellement des résultats de l'ordre de 2,00 ± 0,30 UI/ml d'hématies.

MAC DOUGALL donne chez des enfants âgés de 4 mois à 4 ans :

G6PD U/100 ml de globules rouges : 154,0 ± 14,60
G6PD U/g d'hémoglobine : 4,8 ± 0,48
G6PD U/$10^{10}$ hématies : 1,28 ± 0,14

Selon COTTE et coll. (18), ces valeurs atteignent chez les prématurés 34 ± 8,5 UI/$10^{11}$ érythrocytes.

Dans le domaine de la pathologie, il existe une activité de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase supérieure à la normale, lors des hémolyses et des syndromes de régénération médullaire, suite à certaines pancytopénies ou aplasies ou plus simplement lors d'anémies en cours de réparation, telles les anémies par carence en acide folique ou en vitamine $B_{12}$. Nous avons eu deux cas de sujets biermériens sous traitement à la vitamine $B_{12}$ chez lesquels nous avons noté des activités de la glucose-6 phosphate-déshydrogénase de 2,56 et 3,86 UI/ml d'hématies. Ce phénomène est la conséquence de la libération dans la circulation d'un grand nombre de cellules jeunes à équipement enzyma-

tique important. Par contre, dans les anémies hémolytiques non sphérocytaires dues à une déficience en cet enzyme, nous avons observé une activité très réduite de l'ordre de 0,10 à 0,20 U/ml chez les homozygotes, de 0,8 ± 0,2 U/ml chez les hétérozygotes. Cette tare liée au sexe est plus fréquente chez les hommes que chez les femmes qui ont plus de chances d'être hétérozygotes, c'est-à-dire apparemment normales que homozygotes, donc tarées. L'hémolyse se manifeste souvent brutalement après administration de médicaments tels les dérivés de noyaux aminoquinoléiques ou aromatiques aminés. A tous ces produits il convient d'ajouter un principe actif contenu dans les fèves et qui touche de nombreuses peuplades méditerranéennes, en particulier les Sardes et les Kurdes.

## Chapitre II

## DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA 6PGD ÉRYTHROCYTAIRE

### PRINCIPE.

La 6-phospho-gluconate-déshydrogénase catalyse la réaction suivante :

6-phospho-gluconate + NADP ⟶ ribulose-5-phosphate + $CO_2$ + $NADPH_2$

Tout comme la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, on mesure la variation de densité optique du NADP à 340 nm et à pH 7,4, en présence du substrat : le 6-~~phospho~~-gluconate. Elle est proportionnelle à l'activité de la 6-phospho-gluconate-déshydrogénase.

### TECHNIQUE PERSONNELLE.

On prélève 5 ml de sang veineux sur héparine, puis on procède au lavage et à l'hémolyse des hématies, selon les modalités décrites pour le dosage de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

Dans une cuve de spectrophotomètre de 10 mm, introduire :

Solution tamponnée ..... 2,75 ml
Solution de coenzyme ..... 0,10 ml
Hémolysat ..... 0,10 ml

S'assurer que la température de la solution soit voisine de 25°C. Placer la cuve dans l'appareil et régler la densité optique de la solution à 0,300 en jouant sur la largeur de la fente ou éventuellement sur la sensibilité. La longueur d'onde utilisée est de 340 nm. Ajouter alors :

Solution de substrat ..... 0,05 ml

Agiter avec une baguette et réajuster au zéro en opérant sur la largeur de la fente. Faire démarrer le chronomètre et lire l'augmentation de la densité optique de minute en minute pendant au moins 5 minutes.

Effectuer le microhématocrite sur le culot globulaire, comme il est décrit pour le dosage de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

### RÉACTIFS.

1°) Solution tamponnée :

C'est une solution de triéthanolamine 50 mM à pH 7,6 con-

tenant 5 mM d'éthylène-diamine-tétraacétate de sodium.

Le réactif se conserve un an à la température du laboratoire.

2°) Solution de coenzyme :

Elle contient 10 mM de NADP.

Elle se conserve 4 semaines à environ + 4°C.

3°) Solution de substrat :

Il s'agit d'une solution de 6-phospho-gluconate de sodium à la concentration de 82 mM.

Ce réactif se conserve environ 4 semaines à + 4°C.

4°) Solution physiologique :

NaCl à 9 g par litre.

CALCULS.

Les résultats sont exprimés en unités internationales par ml de culot globulaire à 340 nm à 25°C et à pH 7,6.

A 340 nm :

$$6PGD\ mU/ml = \Delta E \cdot min^{-1} \times \frac{100}{1,035} \times \frac{100}{Ht}$$

A 366 nm :

$$6PGD\ mU/ml = \Delta E \cdot min^{-1} \times \frac{100}{0,55} \times \frac{100}{Ht}$$

RÉSULTATS.

L'activité de la 6-phospho-gluconate-déshydrogénase est en moyenne de 1,0 UI/ml d'hématies avec des variations de plus ou moins 0,2 UI/ml .

Les chiffres donnés par MAC DOUGALL (214) sont de :

| | |
|---|---|
| 6PGD U/100 ml de globules rouges : | 77 ± 2,64 |
| 6PGD U/g d'hémoglobine : | 2,4 ± 0,15 |
| 6PGD U/$10^{10}$ hématies : | 0,69 ± 0,05 |

Pour LÖHR (18), l'activité est de 7,7 ± 0,8 UI/$10^{11}$ érythrocytes. Comme pour la G6PD, les valeurs sont légèrement plus élevées chez le jeune enfant. Nous trouvons personnellement une

activité de 1,2 ± 0,1 UI/ml . Selon MAC DOUGALL (214) chez des enfants âgés de 4 mois à 4 ans, l'activité est de :

6PGD U/100 ml de globules rouges : 78 ± 5,70
6PGD U/g d'hémoglobine : 2,4 ± 0,13
6PGD U/$10^{10}$ hématies : 0,65 ± 0,05

COTTE et coll. (18) donnent :

12 ± 4 UI/$10^{11}$ érythrocytes chez des enfants de deux mois à un an,

14 ± 5 UI/$10^{11}$ érythrocytes chez des prématurés.

Le déficit en 6-phospho-gluconate-déshydrogénase atteint une fréquence de 0,3 p.cent dans la race noire, et de 0,7 p.cent dans la race blanche. Les premiers cas publiés par BREWER et DERN (170) d'une part, PARR et FITCH (171) d'autre part,montrent un abaissement de l'activité d'environ 50 p.cent, mais les sujets ne présentent pas d'anémie hémolytique. Les deux cas publiés par LAUSECKER et coll.(172) et SCIALOM et NAJEAN (173) présentent un syndrome hémolytique net avec anémie,mais chez ces sujets la tare n'est pas démontrée avec certitude. Pour ces auteurs, le déficit modéré était sans rapport avec l'hyperhémolyse. COTTE (18) publie en outre un cas de déficit associé en 6-phospho-gluconate-déshydrogénase et en glucose-6-phosphate-déshydrogénase. On classe donc encore le déficit en 6-phospho-gluconate-déshydrogénase parmi les déficiences enzymatiques sans manifestation clinique.

En ce qui concerne le test de réduction de la méthémoglobine, le test de stabilité du glutathion et les tests colorés, ils sont toujours normaux dans les cas de déficit en 6-phospho-gluconate-déshydrogénase.

- - -

## ÉLECTROPHORÈSE DE LA 6PGD ÉRYTHROCYTAIRE

(selon PARR, FITCH, CARTER)

TECHNIQUE.

Prélever 2 ml de sang veineux sur ACD ou sur EDTA. Eviter l'héparine qui intervient dans le comportement électrophorétique de la 6-phospho-gluconate-déshydrogénase, cependant il est possible d'utiliser du sang prélevé sur héparine à condition de laver soigneusement les globules avant l'hémolyse. Il est encore possible de pratiquer une électrophorèse donnant des résultats satisfaisants sur du sang conservé deux à trois semaines à + 4°C.

A 0,2 ml de sang, ajouter 0,4 ml d'eau distillée. Laisser reposer 10 minutes, puis centrifuger 10 minutes à 3000 t/minute. Déposer 50 µl d'hémolysat limpide sur des bandelettes de papier Whatman n° 17 de 15 mm x 5 mm environ.

L'électrophorèse en gel d'amidon est effectuée à température du laboratoire pendant 4 heures sous un gradient de potentiel compris entre 12 et 16 volts par centimètre. La température est maintenue constante par un courant d'eau froide. Le gel est préparé en utilisant un tampon phosphate 0,01 M et à pH 7,0. L'électrophorèse arrivée à son terme, on coupe la plaque de gel d'amidon en son milieu et on procède au développement en y versant lentement un mélange contenant de l'agar de telle manière qu'au bout d'une minute ou deux, il se soit solidifié, prévenant ainsi de la diffusion et permettant l'obtention d'un zymogramme net.

Ce révélateur est une solution contenant :

| | |
|---|---|
| Agar ..... | 200 mg |
| Tampon tris 0,3 M pH 8,0 ..... | 7 ml |
| $MgCl_2$ 0,1 M ..... | 7 ml |
| Eau distillée ..... | 6 ml |

Le tout est porté à ébullition et refroidi à 50°C environ, puis on ajoute :

| | |
|---|---|
| MTT ..... | 4 mg |
| Phénazine-méthosulfate 1,6 mg/ml .. | 0,5 ml |
| NADP 20 mg/ml ..... | 0,1 ml |
| 6-phospho-gluconate 80 mg/ml ..... | 0,25 ml |

MTT = 3-(4,5-diméthyl-thiazolyl-2)-2,5-diphényl-tétrazolium-bromide.

Laisser le développement se faire à l'obscurité. Les bandes de migration sous la forme de zones bleues intenses, sont visibles au bout de 30 à 40 minutes.

RÉSULTATS.

Ils montrent essentiellement trois variétés électrophorétiques. La plus courante est désignée par "type A". Elle existe chez 95,7 p.cent des sujets et se définit par une bande a très nette, migrant à 2 cm environ de l'origine vers l'anode.

Le deuxième type nommé "Common Variant" se rencontre chez 4,1 p.cent des individus et est composé de trois bandes. La plus rapide d'entre elles est similaire à la bande a décrite précédemment. La bande centrale b apparaît avec la même intensité que a . La bande cathodique c toujours visible dans les leucocytes, apparaît plus ou moins nettement dans les hémolysats. La troisième variété désignée par "type C" se retrouve seulement chez 0,09 p.cent des individus. Ici c'est la bande cathodique c qui domine, la bande b étant aussi apparente, mais la bande a n'est que légèrement estompée.

## Chapitre III

## DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA PYRUVATE-KINASE ÉRYTHROCYTAIRE

### PRINCIPE.

La pyruvate-kinase catalyse la réaction :

$$\text{phospho-énol-pyruvate} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{pyruvate} + \text{ATP}.$$

La réaction est réversible et se déroule du composé de plus grande concentration vers celui de plus faible concentration en fonction du pH et de la concentration des nucléotide-phosphates. Elle nécessite en outre la présence d'ions $K^+$ et $Mg^{++}$.

Dans ce cas, il n'est pas possible de suivre l'augmentation de densité optique du coenzyme à 340 ou 366 nm . Le substrat n'est pas lui-même sensible à une déshydrogénase, mais à un enzyme d'appoint qui le transformera en un autre intermédiaire métabolique qui sera à son tour oxydé par une déshydrogénase à NAD. Ainsi le phospho-énol-pyruvate sera dosé en présence d'ADP, de pyruvate-kinase, de lactico-déshydrogénase et de $NADH_2$ en excès.

$$\text{PEP} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{pyruvate} + \text{ATP}$$

$$\text{pyruvate} + NADH_2 \xrightarrow{\text{LDH}} \text{lactate} + \text{NAD}$$

### TECHNIQUE.

Nous avons utilisé la technique de TANAKA (39) que nous avons modifiée comme suit :

On prélève 5 ml de sang veineux sur héparine, puis on procède au lavage et à l'hémolyse des hématies, selon les modalités décrites pour le dosage de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

Dans une cuve spectrophotométrique de 10 mm, introduire successivement :

| | |
|---|---|
| Solution tampon ..... | 2,28 ml |
| Solution $SO_4Mg$, KCl ..... | 0,15 ml |
| Solution de phospho-énol-pyruvate .. | 0,20 ml |
| Solution d'ADP ..... | 0,20 ml |
| Solution de $NADH_2$ ..... | 0,05 ml |
| Solution de LDH ..... | 0,02 ml |

Mélanger soigneusement; s'assurer que la température du mélange est voisine de 25°C en le plaçant 10 minutes au bain-marie. Placer la cuve dans l'appareil et régler la densité optique de la

solution à 0,400 en jouant sur la largeur de la fente ou éventuellement sur la sensibilité. La longueur d'onde utilisée est de 340 nm .

Ajouter alors :

Hémolysat ..... 0,10 ml

Agiter avec une baguette et réajuster au zéro en opérant sur la largeur de la fente. Faire démarrer le chronomètre et lire la diminution de la densité optique de minute en minute pendant 5 minutes.

RÉACTIFS.

1°) Solution tampon :

Elle est composée de triéthanolamine 50 mM à pH 7,6 contenant 5 mM d'éthylène-diamine-tétraacétate de sodium.

Le réactif se conserve un an à la température du laboratoire.

2°) Solution $SO_4Mg$, KCl :

Il s'agit d'une solution de sulfate de magnésium 0,5 M dans une solution de chlorure de potassium 2 M .

3°) Solution de phospho-énol-pyruvate à 5 mg/ml .

4°) Solution d'acide adénosine-diphosphorique à 10 mg/ml .

5°) Solution de nicotinamide-adénine-dinucléotide à 10 mg/ml .

6°) Solution de lactico-déshydrogénase à 5 mg/ml exempte de pyruvate-kinase.

7°) Solution physiologique à 9 g/l de NaCl .

CALCULS.

Les résultats sont exprimés en unités internationales par ml d'hématies à 340 nm , à 25°C et à pH 7,6

$$PK\ mU/ml = \Delta E \cdot min^{-1} \times \frac{100}{1,035} \times \frac{100}{Ht}$$

A 366 nm, on aurait :

$$PK\ mU/ml = \Delta E \cdot min^{-1} \times \frac{100}{0,55} \times \frac{100}{Ht}$$

RÉSULTATS.

Décrite pour la première fois en 1962 par VALENTINE, TANAKA et coll.(39), le déficit en pyruvate-kinase se classe en seconde position des érythroenzymopathies. Selon BOIVIN (44), elle représente six p.cent des cas d'ictères hémolytiques atypiques. Actuellement plus de 60 cas ont été publiés.

Il faut signaler l'extrême labilité de l'enzyme à la température, et il sera donc très important d'effectuer le dosage au plus vite pour avoir des résultats reproductibles. Nous avons observé personnellement une diminution de l'activité de 40 p.cent au bout de 24 heures.

Notre méthode, dérivée de celle de TANAKA, nous donne des résultats de l'ordre de 2,20 UI/ml d'hématies avec des variations de plus ou moins 0,30 UI/ml. Ces valeurs sont plus élevées chez le jeune enfant où elles atteignent 2,50 $\pm$ 0,30 UI/ml d'hématies.

Ces résultats sont confirmés par ceux de LÖHR et de COTTE et coll. (18). Chez l'adulte les valeurs sont de 41,7 $\pm$ 6,3 UI/$10^{11}$ érythrocytes. Elles atteignent 43 $\pm$ 15 UI entre 2 mois et 1 an et 60 $\pm$ 22 UI chez le prématuré.

Lors des déficits, ces chiffres tombent entre 8 et 29 p. cent de la normale, soit une moyenne de 17 p.cent chez l'homozygote. Ils peuvent atteindre 32 à 80 p.cent, soit une moyenne de 57 p.cent de la normale chez l'hétérozygote. Cependant, il faut préciser qu'un déficit intra-érythrocytaire en pyruvate-kinase n'est pas accompagné du même déficit intra-leucocytaire. On a en effet trouvé des valeurs normales de la pyruvate-kinase dans les leucocytes, lors des érythroenzymopénies dues à cet enzyme.

Au cours des régénérations médullaires intenses marquées par une importante réticulocytose, on observe constamment une élévation de l'activité à côté de l'hexokinase, de l'aldolase et de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase. Les autres activités sont soit normales, soit modérément augmentées. La pyruvate-kinase intervient aussi dans les phénomènes de vieillissement du globule. Cette thèse se trouve confirmée par les travaux de POWELL et DE GOWIN (215) qui publient des valeurs de la pyruvate-kinase de 9,3 UI/g d'hémoglobine dans les hématies âgées, contre 16,8 UI/g d'hémoglobine dans les hématies jeunes séparées par centrifugation différentielle.

VALENTINE et TANAKA (39) aboutissent aux mêmes conclusions : pour eux, l'activité normale de la pyruvate-kinase est de 2,65 ± 0,34 UI/$10^{10}$ érythrocytes. Elle atteint dans la

maladie de Minkowski Chauffard ..... 5,68 UI/$10^{10}$érythrocytes
drépanocytose ..... 6,75 UI
hémoglobinurie nocturne paroxystique .. 5,84 UI
anémie hémolytique par déficit en G6PD. 6,48 UI
anémie mégaloblastique type Biermer ... 6,90 UI

Ces résultats se trouvent confirmés dans nos expériences personnelles par deux cas d'anémies de Biermer où nous avons aussi trouvé des activités élevées : 9,26 UI et 5,42 UI/ml d'hématies.

## Chapitre IV

# DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA LACTICO-DÉSHYDROGÉNASE ÉRYTHROCYTAIRE

PRINCIPE.

La lactico-déshydrogénase catalyse la réaction

$$\text{lactate} + \text{NAD} \rightleftharpoons \text{pyruvate} + \text{NADH}_2$$

Cette réaction est réversible et équilibrée vers la production de lactate ou de pyruvate suivant leur concentration respective et celle des coenzymes et le pH du milieu.

En pratique on utilise le pyruvate comme substrat et on mesure la diminution de la densité optique du $NADH_2$ à 340 nm .

TECHNIQUE.

Elle dérive de celle de WROBLEWSKI et LA DUE (228).

On prélève 5 ml de sang veineux sur héparine, puis on procède au lavage et à l'hémolyse des hématies, selon les modalités exposées dans le dosage de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

Dans une cuve de spectrophotomètre de 10 mm, introduire :

Solution de substrat tamponnée. 2,75 ml
Solution de coenzyme ..... 0,05 ml

Mélanger, placer 5 minutes à 25°C, puis introduire rapidement :

Hémolysat ..... 0,20 ml

Mélanger rapidement. Régler le spectrophotomètre sur une densité optique arbitraire de 0,800 et faire démarrer le chronomètre. Mesurer la diminution de densité optique pendant exactement 1 minute.

RÉACTIFS.

On utilise le coffret Boehringer - Réf. TC-Gl n° 15 977.

1°) Solution de substrat tamponnée :

Elle contient du tampon phosphate 0,05 M, pH 7,5 et du pyruvate de sodium à la concentration de 0,3 mM.

Dissoudre le contenu du flacon 1 du coffret dans 110 ml d'eau bidistillée.

Le réactif se conserve un an à + 4°C.

2°) Solution de coenzyme :

Elle renferme du $NADH_2$ à la concentration de 9 mM soit 6,3 mg de sel de sodium par ml .

Dissoudre le contenu du flacon 2 du coffret avec 0,7 ml d'eau bidistillée.

Le réactif se conserve pendant 4 semaines à + 4°C.

3°) Solution physiologique de NaCl à 9 g/l .

CALCULS.

Il y a peu de temps encore, on exprimait l'activité de la lactico-déshydrogénase en unités arbitraires Wroblewski. Actuellement la nomenclature internationale tend à se généraliser et on donne les résultats en unités internationales.

L'unité Wroblewski est la quantité d'enzyme capable de produire une variation de densité optique de 0,001 par minute à 340 nm de 3 ml de mélange réactionnel dans une cuve de 10 mm de trajet optique. La variation de densité optique, multipliée par 1000 et corrigée par rapport au volume de mélange réactionnel et à la dilution de l'hémolysat ou des globules rouges, permet d'obtenir l'activité enzymatique en ces unités.

$$\text{LDH UW/ml d'hémolysat} = \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \times 10^3 \times \frac{1}{0,2}$$

$$= \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \times 5 \times 10^3$$

soit par ml d'hématies :

$$\text{LDH UW/ml} = \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \times 5 \times 10^3 \times \frac{4}{0,2} \times \frac{100}{Ht}$$

$$= \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \times 10^5 \times \frac{100}{Ht}$$

Une Unité Internationale étant la quantité d'enzyme capable de transformer une micromole de substrat par minute et à 25°C :

$$\text{LDH UI/ml d'hématies} = \frac{\Delta E \cdot \text{min}^{-1}}{6,22} \times \frac{3}{0,2} \times \frac{4}{0,2} \times \frac{100}{Ht}$$

$$= \frac{\Delta E \cdot \text{min}^{-1}}{2,07} \times 100 \times \frac{100}{Ht}$$

RÉSULTATS.

La lactico-déshydrogénase n'a jusqu'à ce jour suscité qu'un intérêt secondaire dans la pathologie enzymatique du globule

rouge. En effet, aucune déficience n'a été relevée à ce jour. Cet enzyme joue cependant un rôle important dans la vie de l'hématie, car il intervient pour une grande part dans les mécanismes de vieillissement de la cellule.

Si nous exprimons les résultats en Unités Wroblewski par ml, nous obtenons des valeurs de l'ordre de 2000 U avec des variations de plus ou moins 200 U. En Unités Internationales par ml d'hématies, nous trouvons des résultats de 22 UI avec des variations de plus ou moins 3 UI par ml .

LÖHR exprime ses valeurs par rapport à $10^{11}$ érythrocytes : il trouve ainsi 270 $\pm$ 36,7 UI .

Les valeurs sont plus élevées chez le jeune enfant. Ainsi COTTE et coll. (18) publient des valeurs de 278 $\pm$ 85 UI/$10^{11}$ érythrocytes chez l'enfant de 2 mois à 1 an et de 370 $\pm$ 116 UI/$10^{11}$ érythrocytes chez le prématuré. On retrouvera aussi des valeurs élevées, lors d'hémolyse ainsi que dans les syndromes de régénération médullaire, tout comme pour la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, la 6-phospho-gluconate-déshydrogénase et la pyruvate-kinase.

## Chapitre V

# DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DES GLUTATHIONS-RÉDUCTASES ÉRYTHROCYTAIRES

PRINCIPE.

La glutathion-réductase existe sous deux formes distinctes, suivant qu'elle utilise le $NADH_2$ ou le $NADPH_2$ comme coenzyme. Elle catalyse la réaction suivante :

$$GSSG + \begin{matrix} NADPH + H^+ \\ NADH + H^+ \end{matrix} \longrightarrow 2\ GSH + \begin{matrix} NADP \\ NAD \end{matrix}$$

Pour déterminer son activité, il suffira donc de suivre spectrophotométriquement la diminution de densité optique du NAD ou du NADP à 340 nm . Le pH utilisé ne sera pas le même pour les deux enzymes. En effet, le pH optimum de la glutathion-réductase $NADPH_2$ dépendante se situe aux environs de 6,6 , alors que celui de la glutathion-réductase $NADH_2$ dépendante sera de 6,2 . Ceci confirme donc bien l'existence de deux enzymes distincts.

TECHNIQUE.

Prélever 5 ml de sang veineux sur 1 à 2 ml de solution d'ACD, puis on procède au lavage et à l'hémolyse des hématies selon les modalités exposées dans le dosage de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

1°) Détermination de la glutathion-réductase $NADPH_2$ dépendante:

Dans une cuve de spectrophotomètre de 10 mm de trajet optique, introduire :

| | |
|---|---|
| Solution tamponnée ..... | 2,70 ml |
| Solution de coenzyme ..... | 0,10 ml |
| Hémolysat ..... | 0,10 ml |

Mélanger soigneusement. Placer 5 minutes à 25°C, puis ajouter :

| | |
|---|---|
| Solution de substrat ..... | 0,10 ml |

Mélanger rapidement. Régler le spectrophotomètre sur une densité optique arbitraire de 0,400 et faire démarrer le chronomètre. Mesurer la diminution de densité optique de minute en minute pendant 5 minutes.

2°) Détermination de la glutathion-réductase $NADH_2$ dépendante :

Dans une cuve spectrophotométrique de 10 mm, introduire :

Solution tamponnée ..... 2,65 ml
Solution de coenzyme ..... 0,05 ml
Hémolysat ..... 0,20 ml

Mélanger et placer au thermostat à 25°C pendant quelques minutes. Placer la cuve dans l'appareil et régler la densité optique de la solution à 0,800 en jouant sur la largeur de la fente ou éventuellement sur la sensibilité, la longueur d'onde utilisée étant de 340 nm . Ajouter alors :

Solution de substrat ..... 0,10 ml

Réajuster au zéro en opérant sur la largeur de la fente. Faire démarrer le chronomètre et relever immédiatement la densité optique. Refaire une lecture au bout de 20 minutes en ayant pris soin de faire un témoin contre de l'eau.

RÉACTIFS.

1°) Glutathion-réductase à $NADPH_2$ :

- solution tampon : tampon phosphate 67 mM, pH 6,6 .

a) 9,087 g de $PO_4H_2K$ pour 1000 ml d'eau bidistillée

b) 11,876 g de $PO_4HNa_2$, 2 $H_2O$ dans 1000 ml d'eau bidistillée; diluer 360 ml de (b) à 1000 ml avec la solution (a).

- solution de coenzyme : solution de $NADPH_2$ $6 \times 10^{-3}$ M.

Dissoudre 60 mg de $NADPH_2Na_4$ dans 10 ml de bicarbonate de soude à 1 p.cent.

- solution de substrat : solution de glutathion oxydé $7,5 \times 10^{-3}$ M.

Dissoudre 230 mg de glutathion oxydé dans environ 20 ml d'eau bidistillée. Ajuster à pH 6,6 avec NaOH N et diluer à 50 ml avec de l'eau bidistillée.

Cette solution se conserve 4 semaines gelée.

2°) Glutathion-réductase à $NADH_2$ :

- solution tampon : tampon phosphate 67 mM, pH 6,2 .

a) 9,087 g de $PO_4H_2K$ pour 1000 ml d'eau bidistillée

b) 11,876 g de $PO_4HNa_2$, 2 $H_2O$ dans 1000 ml d'eau bidistillée; diluer 185 ml de (b) à 1000 ml avec la solution (a).

- solution de coenzyme : solution de $NADH_2$ $1,2 \times 10^{-2}$ M.

Dissoudre 100 mg de $NADH_2Na_2$ dans 10 ml de bicarbonate de soude à 1 p.cent.

- solution de substrat : solution de glutathion oxydé $7,5 \times 10^{-3}$ M .

- eau physiologique : solution de NaCl à 9 g/l .

- solution anticoagulante : ACD fourni par le Centre de Transfusion Sanguine de Strasbourg. La formule est décrite dans le dosage de l'ATPase.

CALCULS.

1°) Glutathion-réductase à $NADPH_2$ :

$$\text{G.R. mU/ml} = \frac{\Delta E \cdot \text{min}^{-1}}{6,22} \times \frac{3}{0,1} \times \frac{4}{0,2} \times \frac{100}{Ht}$$

$$= \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \times \frac{100}{1,035} \times \frac{100}{Ht}$$

2°) Glutathion-réductase à $NADH_2$ :

$$\text{G.R. mU/ml} = \frac{\Delta E \cdot 20 \text{ min}}{6,22 \times 20} \times \frac{3}{0,2} \times \frac{4}{0,2} \times \frac{100}{Ht}$$

$$= \frac{\Delta E \cdot \text{min}^{-1}}{2,07} \times 100 \times \frac{100}{Ht}$$

RÉSULTATS.

Plusieurs dizaines de cas de déficits ont été rapportés à ce jour. En pratique courante, les observations publiées dans la littérature ne concernent que la $NADPH_2$ glutathion-réductase, qui est de beaucoup la plus active. Cependant les déficiences portent toujours sur les deux variantes $NADPH_2$ et $NADH_2$ dépendantes. Il s'agit donc d'un déficit associé. Nos résultats personnels sont de 0,90 UI/ml de globules rouges avec des variations de plus ou moins 0,20 UI/ml pour la glutathion-réductase $NADPH_2$ dépendante. Ils ne sont que de 0,30 ± 0,10 UI/ml d'hématies pour la glutathion-réductase $NADH_2$ dépendante. Contrairement à certains auteurs, nous ne trouvons qu'une faible augmentation de l'activité dans les globules jeunes. En effet, les valeurs normales publiées par LÖHR d'une part, COTTE et coll. (18) d'autre part, sont de 9,7 ± 1,3 UI/$10^{11}$ érythrocytes chez l'adulte. Elles atteignent 14 ± 4 UI chez le nourrisson de 2 mois à un an et 15 ± 5 UI chez le prématuré. Pour ces auteurs, il s'agit toujours de la glutathion-réductase à $NADPH_2$.

VOLPATO et coll.(216) rapportent des activités de 2,08 UI/g d'hémoglobine pour la $NADPH_2$ dépendante et 0,66 UI/g d'hémoglobine pour la $NADH_2$ dépendante. Enfin BRITTINGER et coll.

(65), publiant un déficit congénital avec diminution de 50 p. cent de la glutathion-réductase à $NADPH_2$ et de 36 p.cent pour celle à $NADH_2$, trouve des valeurs normales de 4 990 ± 279 UI/ $10^{11}$ érythrocytes pour l'enzyme à $NADPH_2$ et de 1 280 ± 223 pour l'enzyme à $NADH_2$. On peut donc en conclure que l'activité de la glutathion-réductase à $NADH_2$ est le quart de celle à $NADPH_2$.

D'après LÖHR, il existerait plusieurs types de déficits en glutathion-réductase, tout comme pour la glucose-6-phosphate-déshydrogénase. L'une des variantes serait caractérisée par un abaissement de la glutathion-réductase à 10 p.cent de la normale, anémie hémolytique chronique avec glutathion réduit diminué et instable. L'autre variante s'accompagnerait en plus d'une leucopénie et d'une thrombopénie sous l'influence de certains médicaments, également dangereux pour les sujets atteints de déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase. Par contre, dans cette forme le glutathion réduit ne serait ni instable, ni diminué. Dans ce cas, l'activité enzymatique serait abaissé à 50 p.cent de la normale. Ainsi que nous l'avons décrit pour la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, les tests de BEUTLER et de stabilité du glutathion réduit, sont souvent perturbés dans le déficit en glutathion-réductase, de même qu'on relève souvent une diminution du taux de glutathion réduit.

Enfin DREYFUS (218) signale l'augmentation de l'activité de la glutathion-réductase, lors de l'anémie de Biermer, dans les cancers du foie et les porphyries aiguës. Cette même activité diminue dans les anémies hypoplasiques. Par contre, l'activité demeure normale dans les processus régénératifs même avec réticulocytose intense. L'activité de la glutathion-réductase se conserve dans le sang congelé 4 à 6 jours et est inhibée par l'héparine à la concentration de 2 x 10 M , surtout pour ce qui est de la réductase à $NADH_2$.

## Chapitre VI

# DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE LA DIAPHORASE ÉRYTHROCYTAIRE

PRINCIPE.

1°) Epreuve de réversion de la méthémoglobine :

Elle consiste à méthémoglobiniser totalement le globule rouge par le nitrite, oxydant doux, franchissant aisément la membrane érythrocytaire. Les globules sont ensuite lavés de façon répétée pour enlever toute trace de nitrite puis incubés à 37°C en présence de glucose, d'inosine ou de lactate. On effectue des prélèvements de globules rouges à des temps successifs et le pourcentage de méthémoglobine résiduelle est mesuré après hémolyse.

Cette épreuve montre que chez les homozygotes les globules rouges traités au nitrite sont incapables de réduire leur méthémoglobine en présence de glucose, d'inosine ou de lactate. La simple addition de bleu de méthylène ou de bleu de Nil entraîne une réduction rapide ouvrant ainsi la voie de la méthémoglobine-réductase à $NADPH_2$, qui apparaît normale chez ces sujets. Il est également possible de déceler les hétérozygotes qui ont une cinétique de réduction de type intermédiaire.

2°) Technique de SCOTT (78), que nous avons modifiée comme suit :

La diaphorase a pour rôle le transfert de l'hydrogène du $NADH_2$ sur un accepteur dont le potentiel d'oxydo-réduction est plus élevé, comblant ainsi l'hiatus électronique qui les sépare. Un tel hiatus existe entre le système $NADH_2$/NAD et le système méthémoglobine/hémoglobine. Mais la vitesse de transfert étant près de 10 000 fois plus rapide sur le dichloro-phénol-indophénol, ce colorant est utilisé comme substrat dans la méthode décrite par SCOTT.

Ceci nous est confirmé par les potentiels d'oxydo-réduction des différents systèmes intéressant le globule rouge :

| | |
|---|---|
| NADH, $H^+$ / NAD ..... | - 0,32 e.v. |
| NADPH, $H^+$ / NADP ..... | - 0,32 |
| GSH / GSSG ..... | - 0,25 |
| lactate / pyruvate ..... | - 0,19 |
| bleu de méthylène Réd. / Oxyd. ..... | + 0,01 |
| acide ascorbique / déhydroascorbique ..... | + 0,08 |
| hémoglobine / méthémoglobine ..... | + 0,15 |
| 2,6-dichlorophénol-indophénol Réd. / Oxyd. | + 0,22 |

Il s'agit donc d'apprécier la vitesse d'oxydation du colorant qui passe du bleu au leucodérivé incolore.

TECHNIQUE.

1°) Préparation de l'hémolysat :

Recueillir 5 ml de sang veineux sur 1 ml de solution d'ACD. Il est possible de faire le prélèvement sur d'autres anticoagulants, mais il a été constaté qu'en présence d'ACD l'activité de la diaphorase se maintient pendant deux semaines.

Séparer les globules du plasma par centrifugation 10 minutes à 3000 t/minute et les laver trois fois avec dix volumes de soluté physiologique tamponné. Ajouter alors aux hématies ainsi traitées un volume égal de ce même soluté physiologique tamponné contenant 1 p.cent de nitrite de sodium. Agiter et laisser reposer 20 minutes à la température du laboratoire. Cette incubation terminée, laver avec grand soin les globules rouges, cinq fois au moins avec dix volumes du soluté physiologique tamponné pour éliminer toute trace de nitrite.

A 0,1 ml de globules rouges oxydés, ajouter 1,9 ml d'eau distillée. Agiter et centrifuger. On sépare ainsi l'hémolysat des stromas.

2°) Dosage de l'activité de la diaphorase :

La teneur en méthémoglobine de l'hémolysat est déterminée en mesurant l'absorption à 600 nm de sa dilution au 1/15e . Celle-ci a pour but de calculer la quantité d'hémolysat qu'il faudra ajouter au mélange réactionnel permettant d'obtenir une cinétique correcte de la réaction. On trouve par la méthode de EVELYN et MALLOY (219) qu'une densité optique de 0,200 à 600 nm dans une cuve de 10 mm de trajet optique, correspond à 1,08 mg de méthémoglobine par millilitre.

A deux cuvettes de 10 mm, ajouter :

| | Réaction | Témoin |
|---|---|---|
| TRIS pH 7,6 | 0,05 ml | 0,05 ml |
| $EDTANa_2$ | 0,10 ml | 0,10 ml |
| 2,6-dichlorophénol-indophénol | 0,05 ml | 0,05 ml |

A l'une des cuves, on ajoute l'hémolysat correspondant à 3,25 mg de méthémoglobine plus de l'eau distillée q.s.p. 2,98 ml .

Au témoin, ajouter 2,78 ml d'eau distillée.

Faire démarrer la réaction par l'addition simultanée dans les deux cuvettes de 0,02 ml de $NADH_2$.

Mesurer la diminution de la densité optique toutes les 3 minutes pendant 21 minutes à 600 nm et à 25°C.

RÉACTIFS.

1°) Solution d'ACD livrée par le Centre de Transfusion Sanguine de Strasbourg, dont la composition est détaillée à propos du dosage de l'ATPase (chapitre VII).

2°) Soluté physiologique tamponné :

Il est composé de solution de NaCl à 9 g/l 9 volumes
et de tampon véronal, pH 7,3 1 volume

Le tampon véronal de pH 7,3 est lui-même composé par

| | |
|---|---|
| HCl 0,1 N ..... | 43,3 ml |
| Solution de véronal sodique 0,001 N | 56,7 ml |

3°) Tampon TRIS, pH 7,6 (trishydroxyméthylaminométhane) :

Il contient :

| | |
|---|---|
| HCl 0,1 N ..... | 38,8 ml |
| TRIS 0,2 M ..... | 25 ml |
| Eau distillée .....q.s.p. | 1000 ml |

4°) EDTA-$Na_2$ (éthylène-diamine-tétraacétate de sodium) :

Il s'agit d'une solution à 10 mM, soit 3,36 mg/ml d'eau distillée.

5°) 2,6-dichlorophénol-indophénol 1,2 mM, soit 0,348 mg/ml d'eau distillée.

6°) Solution de $NADH_2Na_2$ 8,8 mM, soit 6,24 mg/ml d'eau distillée.

CALCULS.

Dans les conditions de l'expérience, la diminution de la densité optique, aussi bien en présence de l'hémolysat qu'avec le témoin, est pratiquement linéaire. Le taux de l'activité de la diaphorase sera exprimé comme étant le changement de l'absorption de la solution d'incubation par minute à 25°C et à pH 7,6. On corrigera la valeur obtenue en défalquant la diminution de densité optique du témoin pris dans les mêmes conditions de l'expérience. Détermination de la quantité d'hémolysat à ajouter dans la réaction : effectuer une dilution au 1/15e de l'hémolysat et en déterminer la densité optique "x" à 600 nm .

D'après EVELYN et MALLOY, une densité optique de 0,200 correspond à une concentration de 1,08 mg de méthémoglobine par millilitre, d'où :

$$\frac{1{,}08 \times \text{"x"}}{0{,}200} = \text{y mg/ml de métHb dans la dilution au 1/15e}$$

soit : y x 15 = z mg/ml de métHb dans l'hémolysat.

On ajoute à la réaction une quantité d'hémolysat correspondant à 3,25 mg de méthémoglobine. Il faudra donc ajouter :

$$\frac{1 \times 3,25}{z} = X \text{ ml d'hémolysat pur.}$$

RÉSULTATS.

Grâce à cette méthode, il est aisé de classer les sujets en normaux, hétérozygotes et homozygotes. Nos valeurs, en accord avec celles de SCOTT (78), sont les suivantes :

- sujet homozygote :

taux compris entre $-1 \cdot 10^{-3}$ et $+5 \cdot 10^{-3}$ $\Delta$O.D./min/mg métHb.

- sujet hétérozygote :

taux compris entre $15 \cdot 10^{-3}$ et $25 \cdot 10^{-3}$ $\Delta$O.D./min/mg métHb.

- sujet sain : taux supérieur à $30 \cdot 10^{-3}$ $\Delta$O.D./min/mg métHb.

Ces résultats nous sont aussi confirmés par ceux de FRICK et coll. (75).

- sujet homozygote :

taux entre $1,5 \cdot 10^{-3}$ et $2 \cdot 10^{-3}$ $\Delta$O.D./min/mg métHb.

- sujet hétérozygote :

taux entre $2,8 \cdot 10^{-3}$ et $4,8 \cdot 10^{-3}$ $\Delta$O.D./min/mg métHb.

- sujet sain :

taux entre $5,3 \cdot 10^{-3}$ et $8,4 \cdot 10^{-3}$ $\Delta$O.D./min/mg métHb.

HARTLEYB et coll.(76) publient un cas de déficit congénital dont le dosage de la diaphorase a été effectué par LÖHR. Ce dernier trouve des résultats normaux compris entre 0,24 et 0,26 $U/10^{11}$ globules rouges.

Cette tare s'accompagne évidemment d'une très nette élévation du taux de méthémoglobine. Alors qu'en temps normal le seuil de la méthémoglobinémie ne dépasse pas 1,2 p.cent chez le sujet sain, elle est de 2 à 6 p.cent chez le sujet hétérozygote et peut atteindre des valeurs considérables chez le sujet homozygote : 38,8 p.cent dans le cas rapporté par FRICK, 62 p. cent dans celui de HARTLEYB.

Chez le nouveau-né, dans les premiers jours de la vie, l'activité diaphorasique des globules rouges peut être nettement inférieure à la normale, tout en se normalisant par la suite. Cette "immaturité" enzymatique alliée à la présence d'hémoglobine foetale plus oxydable, expliquerait bon nombre de cyanoses péri-natales passagères dont on ne retrouve pas la cause. La sensibilité du nourrisson aux nitrites et aux infections entérales à bactéries nitritogènes est vraisemblablement due à une insuffisance diaphorasique transitoire.

## Chapitre VII

## DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE L'ATPase ÉRYTHROCYTAIRE

PRINCIPE.

Action de stromas érythrocytaires renfermant l'enzyme sur de l'ATP de TRIS pendant 1 heure à 37°C à pH 7,6 , puis dosage du phosphore inorganique libéré par la méthode de BRIGGS.

La réaction globale s'écrit :

$$ATP + H_2O \xrightarrow{ATPase} ADP + \text{orthophosphate} + 12\,000 \text{ cal.}$$

Elle ne se fait qu'en présence d'ions $Mg^{++}$, $Na^+$ et $K^+$ selon le schéma :

$$\text{Enzyme} + ATP \xrightarrow{Na^+} \text{"Enzyme - P"}$$

$$\text{"Enzyme - P"} \xrightarrow{K^+} \text{Enzyme} + PO_4H_3$$

Il est aussi possible d'utiliser une technique pratiquée par LÖHR (178) et qui repose sur l'utilisation du coenzyme NADH + $H^+$/NAD. On opère en faisant une chaîne de réactions dont le produit de l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase, l'ADP, sert de substrat à la réaction enzymatique de la pyruvate-kinase.

$$ATP + H_2O \xrightarrow{ATPase} ADP + \text{orthophosphate}$$

$$ADP + PEP \xrightarrow{PK} \text{pyruvate} + ATP$$

$$\text{pyruvate} \xrightarrow[NAD]{NADH_2,\ LDH} \text{acide lactique}$$

A une mole de NAD correspond une mole d'ADP, soit une mole d'ATP hydrolysé.

TECHNIQUE PERSONNELLE.

1°) Préparation des stromas :

- Recueillir le sang à examiner obtenu par ponction veineuse sur une solution d'ACD, à raison de 3 à 4 ml d'ACD pour 10 ml de sang.

- Séparer les hématies du plasma et les laver trois fois avec une solution d'eau physiologique, en prenant soin de bien les remettre en suspension après chaque centrifugation.

- Recueillir 2 ml de culot globulaire qu'on hémolyse par 48 ml d'eau bidistillée glacée, puis saturer l'hémolysat pendant 30 secondes avec de l'anhydride carbonique sous pression, afin d'amener le pH de la solution aux environs de 5,3.

Laisser reposer 5 minutes à + 4°C.

- Séparer les stromas par centrifugation à 3000 t/minute pendant 20 minutes.

- Ajouter à 1 ml de stromas :

9 ml d'eau bidistillée glacée d'une part,
9 ml de solution de saponine à 0,05 p.cent, d'autre part.

Laisser reposer 15 minutes à la température du laboratoire, puis centrifuger et recueillir les stromas.

- Déterminer le microhématocrite des stromas, comme indiqué pour les globules rouges dans le dosage de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

2°) Dosage de l'activité de l'ATPase :

- Incubation en présence d'eau :

| | Mg-Na-K-ATPase | Mg-ATPase | Témoin |
|---|---|---|---|
| TRIS, pH 7,6 | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |
| ATP TRIS | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |
| $MgCl_2$ | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |
| KCl | 0,1 ml | - | 0,1 ml |
| NaCl | 0,2 ml | - | 0,2 ml |
| $H_2O$ bidistillée | - | 0,3 ml | 0,2 ml |
| stromas | 0,2 ml | 0,2 ml | - |

- Incubation en présence de saponine :

| | Mg-Na-K-ATPase | Mg-ATPase | Témoin |
|---|---|---|---|
| TRIS, pH 7,6 | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |
| TRIS ATP | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |
| $MgCl_2$ | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |
| KCl | 0,1 ml | - | 0,1 ml |
| NaCl | 0,2 ml | - | 0,2 ml |
| $H_2O$ bidistillée | 0,1 ml | 0,4 ml | 0,2 ml |
| stromas | 0,1 ml | 0,1 ml | - |

Laisser incuber les tubes pendant 60 minutes au bain-marie à 37°C, puis stopper la réaction en ajoutant 1,2 ml d'acide trichloracétique à 10 p.cent.

3°) Dosage du phosphore libéré :

- Centrifuger le défécat pendant 5 minutes à 4000 t/minute.
- Prélever 1 ml de surnageant et ajouter :

| | |
|---|---|
| eau bidistillée ..... | 3 ml |
| molybdate d'ammonium ..... | 1 ml |
| sulfite de sodium ..... | 0,5 ml |
| hydroquinone ..... | 0,5 ml |

Laisser reposer 20 minutes et lire la coloration bleue obtenue à 610 nm au spectrophotomètre DU Beckman ou au photomètre Lumétron filtre 580. Se reporter à la courbe d'étalonnage.

4°) Etalonnage du phosphore par la méthode de BRIGGS :

A une solution étalon de phosphore, on ajoute du molybdate en excès en présence d'un réducteur, le sulfite de sodium. Il se forme un complexe phosphomolybdeux molybdique bleu, dosable colorimétriquement.

On prépare les dilutions suivantes :

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| solution étalon en ml | 0 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 2,5 | 3 | 3,5 | 4 |
| eau bidistillée en ml | 8 | 7,5 | 7 | 6,5 | 6 | 5,5 | 5 | 4,5 | 4 |
| ce qui correspond à | 0 | 0,005 | 0,010 | 0,015 | 0,020 | 0,025 | 0,030 | 0,035 | 0,040 |
| | mg de phosphore dans la prise | | | | | | | | |

Ajouter à chaque tube :

| | |
|---|---|
| réactif molybdique ..... | 2 ml |
| solution de sulfite de sodium .... | 1 ml |
| solution d'hydroquinone ..... | 1 ml |

Lire après 20 minutes au photocolorimètre à 610 nm en se servant du tube 1 pour faire le zéro. Tracer la courbe, y comparer la coloration obtenue dans le dosage.

RÉACTIFS.

1°) ACD préparé par le Centre de Transfusion Sanguine de Strasbourg. Sa formule est la suivante :

| | |
|---|---|
| acide citrique, 1 $H_2O$ ..... | 1,66 g |
| NaOH ..... | 0,60 g |
| glucose anhydre ..... | 3,00 g |
| eau distillée .....q.s.p. | 100,0 ml |

2°) Eau physiologique :

Solution de NaCl à 9 g/litre dans de l'eau distillée.

3°) Préparation de l'anhydride carbonique :

Introduire dans un erlenmeyer de 100 ml surmonté d'une tubulure, une certaine quantité de carbonate de sodium sur lequel on fait arriver de l'acide chlorhydrique.

Il se produit la réaction suivante :

$$CO_3Na_2 + 2\ HCl \longrightarrow 2\ NaCl + H_2O + CO_2\uparrow$$

4°) Solution de saponine :

saponine ..... 0,5 g
eau bidistillée .....q.s.p. 1000 g

5°) Préparation de l'ATP de TRIS :

On part de ATP-$H_2Na_2$, 3 $H_2O$ Boehringer de poids moléculaire 605,2. On prend du Dowex 50 W $X_2$ 100/200 Mesh (Fluka A.G. Buchs S.G.) dont on lit la capacité en mEq/g de poudre, la capacité étant par définition la quantité d'ion $Na^+$ échangée contre des ions $H^+$. La capacité du Dowex utilisé est de 4,50 mEq/g de poids sec.

On utilise pour le dosage de l'ATP à la concentration de 2,5 mM/litre de solution incubée. Il faudra donc préparer une solution de concentration égale à 0,03 M/l soit 18,156 g/l d'ATP-$H_2Na_2$, 3 $H_2O$.

On prépare 25 ml d'ATP de TRIS. Il faudra prendre :

$$\frac{605,2 \times 25 \times 0,03}{1000} = 0,4539 \text{ g de ATP-}H_2Na_2\text{, 3 }H_2O.$$

On calcule alors la quantité de mEq de $Na^+$ contenu dans ces 0,4539 g . Une molécule-gramme soit 605,2 g de ATP-$H_2Na_2$ , 3 $H_2O$ contient 2 mEq de sodium. Or on utilise 0,4539 g de ATP-$H_2Na_2$, 3 $H_2O$ d'où la quantité de sodium égale à

$$\frac{2 \times 0,4539 \times 1000}{605,2} = 1,5 \text{ mEq de Na}$$

On multiplie cette valeur par 10 soit 15 mEq, car pour éliminer toute la quantité de sodium de l'ATP-$H_2Na_2$, 3 $H_2O$, il faut utiliser une quantité de Dowex dont la capacité est dix fois supérieure à la capacité requise.
On prendra par conséquent une quantité de Dowex correspondant à

$$\frac{15}{4,50} = 3,33 \text{ g de Dowex en poids sec.}$$

Préparation de la colonne :

Dans une colonne mettre le Dowex en suspension dans de l'eau bidistillée. L'eau doit toujours recouvrir le Dowex, afin d'éviter la déshydratation des grains.

Laver avec une quantité de HCl N/10 20 fois supérieure au poids de Dowex utilisé. Faire alors passer de l'eau bidistillée jusqu'à neutralité, puis une solution de TRIS 0,5 N en quantité égale à celle de HCl. Enfin rincer une dernière fois avec de l'eau bidistillée jusqu'à neutralité.

On opère les lavages sous atmosphère d'azote à une pression de 0,6 à 0,8 kg/cm2 afin d'accélérer l'opération.

Lorsque la colonne est ainsi prête à l'usage, y verser la solution de ATP-$H_2Na_2$, 3 $H_2O$ sans opérer de pression. Après dix minutes, ouvrir le robinet afin de laisser écouler l'ATP. Recueillir des fractions de 2,5 ml dans des tubes à hémolyse en polyéthylène. On règle le débit à environ une goutte toutes les 20 secondes.

Contrôle du $Na^+$ et du $K^+$ :

Passer les 10 tubes au photomètre à flamme, afin de s'assurer de l'élimination de tous les ions $Na^+$ et $K^+$. En fait, il subsiste toujours des traces infinitésimales de l'ordre de $10^{-6}$ par rapport à la concentration initiale.

Détermination de la concentration en ATP TRIS :

Mélanger les fractions initiales et terminales d'une part et les fractions intermédiaires d'autre part, afin d'avoir la concentration la plus proche possible de 2,5 mM. Procéder au dosage de l'ATP dans le filtrat.

On effectue une solution-étalon d'ATP-$Na_2$ à 0,03 M diluée au 1/250, 1/500, 1/750, 1/1000. On trace la courbe en fonction de la densité optique à 260 nm . On compare avec la solution d'ATP TRIS diluée au 1/1000 par exemple et on en déduit la concentration.

Neutraliser les deux échantillons d'ATP TRIS avec de la poudre de TRIS au pH-mètre jusqu'à obtention de la neutralité pH 7,0. En effet le pH de l'ATP TRIS après passage sur le Dowex se situe autour de 4,5 à 4,0 , ce qui ne permettrait pas une bonne conservation.

Conserver la solution à + 4°C dans un flacon en polyéthylène.

6°) Tampon TRIS, pH 7,6, 0,2 M :

| | |
|---|---|
| TRIS ..... | 25,0 ml |
| HCl 0,1 N ..... | 38,8 ml |
| $H_2O$ bidistillée .....q.s.p. | 100,0 ml |

7°) Solution $MgCl_2$ 0,12 M préparée à partir de $MgCl_2$, 6 $H_2O$, P.M. 24,4 g .

8°) Solution KCl 0,4 M préparée à partir de KCl anhydre, P.M. 29,8 g .

9°) Solution NaCl 1 M préparée à partir de NaCl anhydre, P.M. 58,5 g .

10°) Acide trichloracétique à 10 p.cent dans de l'eau bidistillée.

11°) Solution étalon de phosphore :

On prépare une solution-mère à 1 mg de phosphore par ml :

$PO_4H_2K$ pur et sec ..... 4,394 g
$H_2O$ bidistillée .....q.s.p. 1 000 ml

Pour obtenir la solution-étalon, il suffit de diluer la solution-mère au 1/100e.

12°) Réactif molybdique :

Dissoudre 25 g de molybdate d'ammonium pur dans 300 ml d'eau bidistillée. Ajouter au mélange refroidi :

$SO_4H_2$ pur (d = 1,84) ..... 75 ml
$H_2O$ distillée ..... 125 ml

13°) Solution d'hydroquinone à 1 p.cent dans l'eau distillée :

Ajouter 1 goutte de $SO_4H_2$ pur pour 100 ml . La solution doit être incolore lors de l'emploi.

14°) Solution de sulfite de sodium à 20 p.cent dans l'eau distillée :

A renouveler fréquemment.

CALCULS.

Les résultats de l'activité de l'ATPase sont exprimés en Unités Internationales, une Unité représentant la quantité d'enzyme capable de libérer à 37°C une micromole de phosphore par heure et par millilitre de stromas érythrocytaires à partir d' ATP.

Cependant, certains auteurs expriment l'activité en mg de phosphore libéré par heure par 100 ml de stromas érythrocytaires à partir d'ATP à 37°C. D'autres enfin ne font une incubation à 37°C que pendant 30 minutes. On fait agir 0,2 ml de stromas en présence de 1 ml de réactifs, ce qui représente un volume de 1,2 ml . Puis on stoppe la réaction enzymatique par 1,2 ml d'acide trichloracétique à 10 p.cent. Le volume final sera donc de 2,4 ml.

Après centrifugation, on reprend 1 ml de surnageant. La quantité de stromas dans la prise d'essai sera donc de

$$\frac{0,2 \times 1}{2,4} = \frac{0,1}{1,2} \text{ ml}$$

On détermine alors la quantité de phosphore libérée par ces $\frac{0,1}{1,2}$ ml de stromas. Il suffit de se reporter à la courbe d'étalonnage après avoir défalqué la densité optique du témoin de celle de la réaction, le témoin ayant pour but de déterminer le phosphore libre ne provenant pas de la réaction enzymatique.

$D.O._R - D.O._T$ = x mg de P libérés par $\frac{0,1}{1,2}$ ml de stromas

d'où $\frac{\text{x mg P} \times 100}{\frac{0,1}{1,2}}$ = "x" x 1,2 x 1000 = y mg P libérés par 100 ml de stromas.

Si la quantité de stromas utilisés pour la réaction n'est que de 0,1 ml nous aurons :

"x" x 2,4 x 1000 = y mg P libérés par 100 ml de stromas.

Pour transformer les milligrammes en micromoles, il suffira de poser $\frac{\text{y mg P} \times 1000}{31 \times 100} = \mu M$ P libéré par heure et par ml de stromas.

Pour éliminer la quantité de liquide inclus dans le stroma, on corrige la valeur trouvée précédemment par un microhématocrite. Celui-ci est compris entre 25 et 85 p.cent. Les résultats ainsi rapportés au volume de 100 p.cent de stromas humides, donne des valeurs reproductibles, éliminant le facteur dilution de ces derniers.

Le calcul sera donc en définitive :

$$\frac{\text{x mg P} \times 1000 \times 1,2 \times 1000 \times 100}{31 \times \text{Ht} \times 100} =$$

$$\frac{\text{x mg P} \times 1,2 \times 10^6}{31 \times \text{Ht}} = \mu M \text{ P/h/ml de stromas humides.}$$

RÉSULTATS.

Etant donné le petit nombre de cas étudiés, chaque auteur publie ses résultats personnels : en effet quatre cas de déficits partiels en Mg-ATPase ont été décrit à ce jour.

Les valeurs normales sont les suivantes :

- pour HARVALD et coll.(177) : 12 à 15 $\mu M$ de phosphore libérées en une heure à 37°C et à pH 7,6 par $10^{10}$ globules rouges.

- pour BREWER et coll.(182) :
  - Na-K-Mg-ATPase : 12,24 µM de phosphore libérées en une heure à 44°C par gramme d'hémoglobine.
  - Mg-ATPase : 15,35 µM de phosphore libérées en une heure à 44°C par gramme d'hémoglobine.
- pour MIRCEVOVA et coll.(179) : les résultats sont donnés en mg de phosphore libérés par heure à 38°C et à pH 7,4 par 100 g de protéines. Le fait d'exprimer les résultats par rapport aux protéines des stromas, élimine le facteur "volume" de ceux-ci. En effet, la teneur en protéines de 100 ml de stromas est en moyenne de 0,914 g selon la méthode de Lowry.

| | Mg+Mg-Na-K-ATPase | Mg-ATPase |
|---|---|---|
| incubation avec $H_2O$ | 6,28 | - |
| incubation avec saponine à 0,05 p.cent | 28,21 | 24,71 |

- valeurs personnelles : nous exprimons nos résultats en mg de phosphore libérés en une heure à 37°C et à pH 7,6 par 100 ml de stromas humides ainsi qu'en µM de phosphore libérés en une heure à 37°C et à pH 7,6 par ml de stromas humides

| | Mg+Mg-Na-K-ATPase | Mg-ATPase |
|---|---|---|
| incubation avec $H_2O$ | 6 à 8 mg | 4 à 6 mg |
| | 1,9 à 2,6 µM | 1,3 à 1,9 µM |
| incubation avec saponine à 0,05 p.cent | 25 à 30 mg | 20 à 25 mg |
| | 8 à 10 µM | 6,5 à 8 µM |

- pour COTTE et coll.(178) qui couplent l'ADP produit lors de l'hydrolyse de l'ATP à la réaction de dosage de la pyruvate-kinase, les résultats sont de 58 ± 13 UI pour $10^{11}$ globules rouges à 25°C et à pH 7,5 .

En accord avec les résultats de MIRCEVOVA et de COTTE, nous ne relevons pas d'augmentation de l'activité ATPasique lors des anémies hémolytiques, dans les syndromes de forte régénération médullaire, ainsi que chez le nouveau-né.

Par contre, les valeurs de la Mg-ATPase augmentent nettement dans la maladie de Minkowski Chauffard, surtout après splénectomie, conséquence d'un besoin croissant en ATP nécessaire pour maintenir le gradient Na-K du sphérocyte.

Nous avons également relevé une nette augmentation de l'activité dans une maladie de Von Jaksch Luzet et dans un cas d'anémie hémolytique qu'il nous a pas été possible de classer à ce jour et qui aurait débuté primitivement par un déficit en 6PGD.

Enfin, LÖHR et J.BERNARD (217) retrouvent un très net abaissement de la Mg-ATPase dans les plaquettes, lors de la thrombasthénie de Glanzmann et qui serait responsable de l' irrétractibilité du caillot.

## Chapitre VIII

## DÉTERMINATION DE L'ATP ÉRYTHROCYTAIRE

PRINCIPE.

La détermination de l'adénosine-triphosphate dans le globule rouge s'effectue par le couplage du coenzyme à une réaction enzymatique dans laquelle il intervient. Pour ce faire, il suffira de s'adresser à l'une des réactions de la glycolyse:

$$\text{glucose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{G6P} + \text{ADP} \qquad (1)$$

$$\text{ou} \quad \text{3-P-glycérate} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{1,3-di-P-glycérate} + \text{ADP} \qquad (2)$$

L'enzyme responsable est l'hexokinase pour la réaction (1), la glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase pour la réaction (2).

Mais comme dans le cas de la pyruvate-kinase, il n'est pas possible de suivre l'augmentation de la densité optique du coenzyme à 340 ou 366 nm . Il faudra donc coupler ces réactions à une deuxième réaction enzymatique qui elle utilisera le coenzyme NADP ou $NADH_2$.

Ainsi CARTIER et coll.(220) s'adressent à la chaîne de réactions suivantes :

$$\text{glucose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{G6P} + \text{ADP}$$

$$\text{G6P} + \text{NADP} \rightleftharpoons \text{6PG} + \text{NADPH}_2$$

Les enzymes qui interviennent sont respectivement l'hexokinase et la glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

Personnellement nous utilisons le deuxième système qui emprunte la voie d'Embden Meyerhof en sens contraire, c'est-à-dire du lactate vers la production de glucose.

$$\text{3-P-glycérate} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{1,3-di-P-glycérate} + \text{ADP}$$

$$\text{1,3-di-P-glycérate} + \text{NADH}_2 \rightleftharpoons \text{glycéraldéhyde-3-P} + \text{NAD}$$

Les enzymes responsables sont la phospho-glycérate-kinase et la glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase.

TECHNIQUE.

Nous utilisons la technique de BÜCHER et SCHUART décrite par la firme Boehringer (Réf. TC - J n° 15 979) que nous avons adaptée au culot globulaire.

Prélever 5 ml de sang veineux sur héparine, puis procéder au lavage et à l'hémolyse des hématies selon les modalités décrites pour le dosage de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase. Il est extrêmement important de vérifier que l'héparine soit exempte de phénol qui inhibe totalement la réaction.

Dans un tube à hémolyse, introduire :

| | |
|---|---|
| culot globulaire ..... | 1 ml |
| eau distillée ..... | 1 ml |
| acide perchlorique ..... | 2 ml |

Agiter vigoureusement, puis centrifuger à 3000 t/minute pendant 15 minutes. Il est très important de diluer les hématies au demi. En effet, l'action de l'acide perchlorique sur les hématies n'est pas assez puissante, ce qui rendrait la défécation incomplète.

Dans une cuve de spectrophotomètre de 10 mm de trajet optique, introduire successivement :

| | |
|---|---|
| solution tamponnée de 3-P-glycérate | 2,50 ml |
| solution de coenzyme ..... | 0,05 ml |
| défécat ..... | 0,20 ml |

Mélanger soigneusement. S'assurer que la température du mélange est voisine de 25°C. Placer la cuve dans l'appareil et régler la densité optique de la solution à 0,400 en jouant sur la largeur de la fente ou éventuellement sur la sensibilité. La longueur d'onde utilisée est de 340 nm . Ajouter alors :

| | |
|---|---|
| solution d'enzyme ..... | 0,05 ml |

Agiter, réajuster au zéro. Faire démarrer le chronomètre et lire la diminution de densité optique au bout de 5 minutes. Pour améliorer la précision des résultats, refaire une lecture au bout de 10 minutes.

REACTIFS.

1°) Solution d'acide perchlorique 0,6 N :

5,2 ml d'acide perchlorique à 70 p.cent dans 100 ml d'eau bidistillée.

2°) Solution tamponnée de 3-phosphoglycérate, pH 7,6 :

| | |
|---|---|
| tampon triéthanolamine ..... | 100 mM |
| sulfate de magnésium ..... | 4 mM |
| 3-phosphoglycérate ..... | 6 mM |

Se conserve 4 mois à + 4°C.

3°) Solution de coenzyme : $NADH_2$ à 12 mM.

Se conserve quatre semaines à + 4°C.

4°) Solution d'enzymes :

phospho-glycérate-kinase ..... 1 mg/ml
glycéraldéhyde-3-P-déshydrogénase ... 4 mg/ml

Se conserve un an à + 4°C.

CALCULS.

$$\text{ATP mU/ml d'hématies} = \frac{\Delta E \cdot min^{-1}}{6,22} \times \frac{3}{0,2} \times \frac{1}{4} \times \frac{100}{Ht}$$

$$= \frac{\Delta E \cdot min^{-1}}{2,07} \times \frac{1}{0,2} \times \frac{1}{4} \times \frac{100}{Ht}$$

$$= \frac{\Delta E \cdot min^{-1}}{2,07} \times 1,25 \times \frac{100}{Ht}$$

$$= \Delta E \cdot min^{-1} \times 0,6 \times \frac{100}{Ht}$$

Il est aussi possible d'exprimer les résultats en milligramme p.cent. Ainsi à 340 nm

$\Delta E \cdot min^{-1}$ x 210 = mg p.cent ATP dans les hématies.

RÉSULTATS.

Ceux-ci sont assez contradictoires. En effet, l'ATP est consommé au cours du stockage et pour avoir des résultats reproductibles, il est nécessaire de faire le dosage dans les deux heures suivant le prélèvement.

Nous trouvons personnellement des valeurs de 1,4 à 1,6 UI/ml d'hématies, soit 30 à 50 mg p.cent ml de globules rouges.

LÖHR publie des valeurs de 16 ± 2 UI/$10^{11}$ érythrocytes. SHOJANIA et coll.(221) donnent des chiffres compris entre 60 et 80 mg/100 ml de globules rouges.

Pour MILLS et coll.(222), les résultats exprimés en µM d'ATP pour 100 ml d'hématies sont de 139 ± 17.

Pour les uns il y aurait augmentation de l'ATP dans les réticulocytes, pour les autres, celle-ci n'existerait pas. Le taux d'ATP diminuerait dans les cas d'anémie hémolytique avec déficience en pyruvate-kinase et en hexokinase. Par contre, celui-ci augmenterait dans le déficit en 2,3-diphospho-glycérate.

RECHERCHES PERSONNELLES

---

# B - ÉTUDE SÉMIOLOGIQUE DE DIFFÉRENTES ANOMALIES ENZYMATIQUES RENCONTRÉES DANS LE GLOBULE ROUGE

# INTRODUCTION

L'interprétation des dosages enzymatiques tout comme leurs déterminations, relèvent du domaine de biochimistes spécialisés. En effet, le dépistage d'un déficit enzymatique est délicat par les questions qu'il pose et les études qu'il suggère : tous ces problèmes interviendront dans l'élaboration du diagnostic.

Entre le prélèvement du sang et les dosages du laboratoire, des pertes d'activité peuvent se produire. L'envoi d'un sang témoin prélevé et transféré dans les mêmes conditions que celui présumé pathologique est alors nécessaire. En outre, l'instabilité des enzymes est plus grande dans les hémolysats que dans les hématies intactes. De plus, certains enzymes pathologiques se caractérisent par leur extrême labilité qui risque de faire surestimer l'importance de leur déficit. Il est connu que les activités enzymatiques des réticulocytes sont beaucoup plus élevées que celles des hématies mêmes. Il sera donc normal de trouver des activités élevées dans les sangs riches en réticulocytes. Au cas où l'on rencontrera par conséquent lors d'une réticulocytose importante une activité de même ordre de grandeur que celle des hématies mûres d'un témoin, on pourra donc envisager un déficit relatif qui deviendrait évident si on le comparait avec une population témoin de même âge.

Dans l'étude des anémies hémolytiques congénitales non sphérocytaires, il faudra envisager plusieurs points :

- le premier est celui des rapports entre le déficit constaté et l'état hématologique. Lorsque l'anomalie frappe un enzyme occupant une place importante dans le métabolisme énergétique de l'hématie, la voie de la glycolyse d'Embden Meyerhof essentiellement ou lorsqu'elle retentit sur les systèmes d'oxydo-réduction, on peut admettre qu'elle puisse entraîner une diminution de la durée de vie des hématies. Il faut pourtant se garder d'établir une relation de causalité systématique entre la présence d'un déficit enzymatique et une hyperhémolyse : certains déficits ont une incidence relativement importante et sont habituellement asymptomatiques : tel par exemple celui de la 6-phosphogluconate-déshydrogénase. Certains autres déficits différents et parfois sans rapport apparent, sont induits secondairement par des mécanismes hypothétiques parmi lesquels peuvent s'inclure des phénomènes d'inhibition dus à l'accumulation de certains substrats : ainsi a-t-on décrit dans les déficits en glucose-6-phosphate-déshydrogénase une diminution de la phospho-mono-estérase, de la catalase, de l'hexokinase, sans que soit précisée la part qui leur revient dans la traduction hématologique éventuelle de la tare.

- le second est celui de la nature congénitale ou acquise de l'enzymopathie. Actuellement la plupart des déficits décrits des systèmes énergétiques et d'oxydo-réduction des globules rouges sont congénitaux. Dans ce cadre, le chapitre des enzymopénies acquises en particulier par inhibition toxique ou médicamenteuse n'est qu'entrouvert. Si la nature congénitale d'un déficit paraît probable, les études familiales précisent, généralement assez vite, le type de la transmission héréditaire. Dans les tares récessives, les dosages d'activité ont souvent permis le dépistage des sujets hétérozygotes. Il faudra rechercher le mécanisme du déficit d'activité. Mais seule l'étude des propriétés caractéristiques de l'activité enzymatique et de la molécule protéique qui en est le support, permet de préciser le type de la mutation génétique. De telles recherches imposent l'isolement de l'enzyme reconnu comme déficitaire et la détermination de ses propriétés physico-chimiques et enzymatiques fondamentales : mobilité électrophorétique, stabilité, pH optimum d'action, constantes d'activité vis-à-vis du substrat et éventuellement des coenzymes, analyse des chaînes peptidiques constitutives, etc... Mais ces investigations sont encore réservées aux laboratoires de recherche spécialisés et ne sont pas encore du domaine de la biologie courante.

- un autre problème est celui des retentissements métaboliques du déficit et dans le cas particulier des hyperhémolyses, celui des liens biochimiques exacts entre l'enzymopénie et l'hyperdestruction globulaire. Ces liens sont soupçonnés plus qu'affirmés dans la majorité des cas et ce n'est pas le moindre problème que de constater qu'à déficit égal, certains sujets sont totalement asymptomatiques, alors que d'autres ont une anémie hémolytique sévère.

Après avoir insisté sur les modalités d'exploration des enzymes du globule rouge, il convient à présent d'aborder l'aspect sémiologique des déficits enzymatiques qui ont été l'objet de nos propres observations, ainsi que leur retentissement sur le métabolisme général du globule rouge.

## Chapitre I

## ÉTUDE D'UN CAS DE DÉFICIT EN GLUCOSE-6-PHOSPHATE-DÉSHYDROGÉNASE

### OBSERVATION.

L'enfant C... Philippe, né le 28 décembre 1965, est admis au Service des prématurés de l'hôpital Louis Pasteur à Colmar. Il présente un ictère isolé avec un taux maximum de 165 mg p. mille de bilirubine libre, indirecte. On ne relève pas d'incompatibilité ABO, ni Rhésus. L'enfant étant de race noire et les parents originaires de la Guyane, on envisage l'hypothèse d'un déficit enzymatique.

### DISCUSSION.

Les déterminations enzymatiques nous sont confiées le 18 janvier 1966. A l'époque, nous n'explorons que trois enzymes de la glycolyse. D'après les résultats obtenus, nous concluons à un déficit hétérozygote en glucose-6-phosphate-déshydrogénase. Le 21 janvier 1966, nous demandons un prélèvement chez le père et la mère de l'enfant, afin de pouvoir préciser le diagnostic. Les résultats s'avèrent concluants : en effet la tare provient de la mère. Elle est liée au sexe et transmise comme un caractère de dominance incomplète du gène mutant X sur le gène allèle x normal.

Les résultats peuvent se résumer dans le tableau XII.

Tableau XII

| | C... Philippe | C... mère | C... père | Valeurs normales |
|---|---|---|---|---|
| G6PD | 0,34 | 0,63 | 1,33 | 1,50 ± 0,30 |
| 6PGD | 1,16 | 0,83 | 0,95 | 0,80 ± 0,20 |
| PK | 2,62 | 1,98 | 1,95 | 2,25 ± 0,25 |

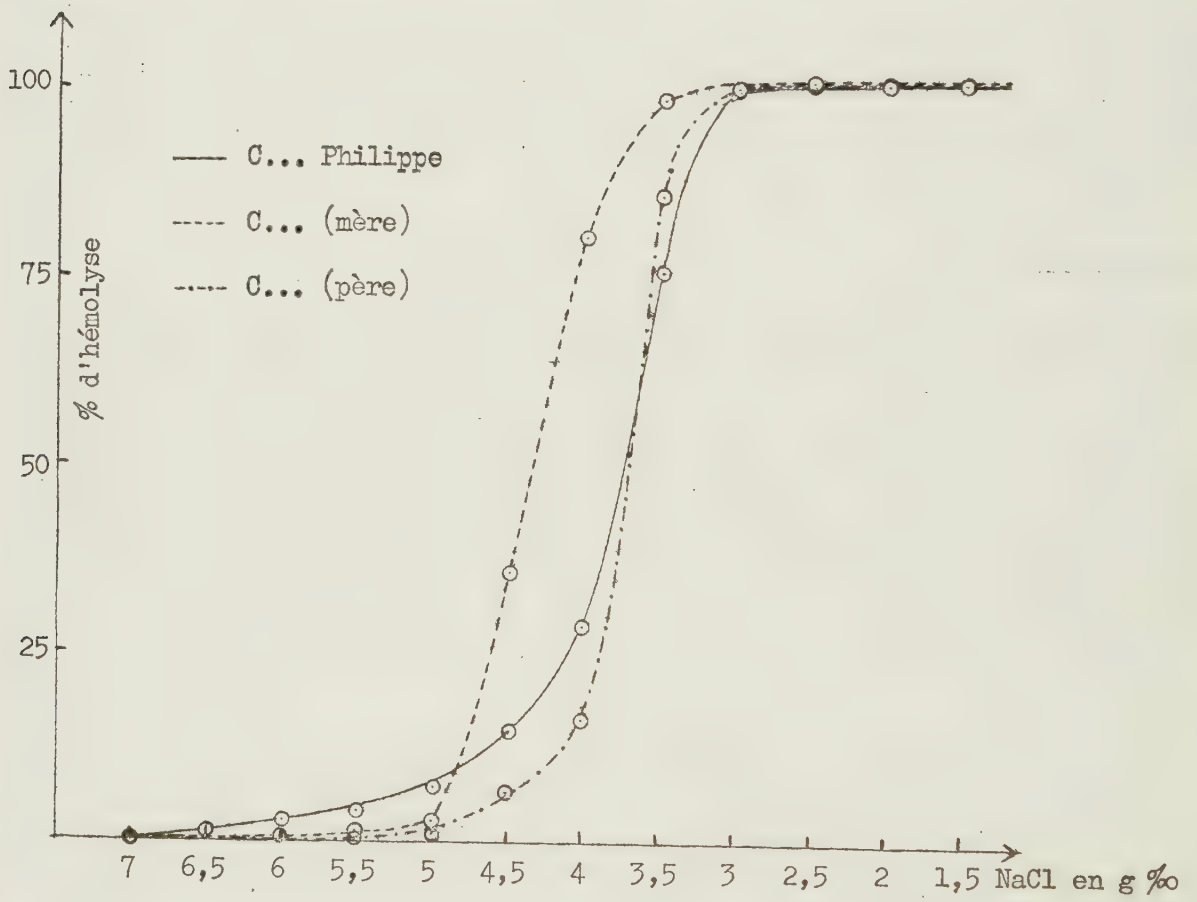
Nos résultats sont exprimés en Unités Internationales/ml d'hématies.

La résistance osmotique en solution saline à des concentrations décroissantes en NaCl selon la méthode de CAZAL (229), montre une résistance accrue des globules déficients. En effet, les courbes d'hémolyse de l'enfant et de la mère sont plus étalées que celle du père (figure 20).

Les valeurs de l'hémolyse sont les suivantes :

| | Hémolyse initiale | Hémolyse totale |
|---|---|---|
| C... Philippe | 6,5 g p.mille | 2,8 g p.mille |
| C... mère | 5,7 g | 2,7 g |
| C... père | 5,3 g | 3,0 g |

Fig. 20 - Détermination de la résistance osmotique chez la famille C...




Ce phénomène, n'ayant pas encore trouvé d'explication valable, a été constaté fréquemment lors des anémies hémolytiques non sphérocytaires avec diminution de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase.

Dans le but de confirmer nos résultats, le Docteur LAUSECKER a fait exécuter un bilan enzymatique complet de son malade par le Professeur LÖHR à Tübingen. Ses résultats confirment bien ceux obtenus dans notre laboratoire (tableau XIII).

Tableau XIII

Détermination des enzymes de la glycolyse chez C... Philippe

| | C... Philippe | C... mère | C... père | Valeurs normales |
|---|---|---|---|---|
| hexokinase | 1,8 | 1,6 | 1,7 | 1,7 ± 0,25 |
| phosphofructokinase | 26,5 | 18,1 | 20,9 | 17,7 ± 2,2 |
| aldolase | 9,2 | 4,9 | 6,1 | 5,0 ± 0,5 |
| phosphoglycérate-isomérase | 147,0 | 90,6 | 66,9 | 75,2 ± 10,9 |
| énolase | 58,3 | 41,7 | 35,0 | 37,5 ± 3,7 |
| pyruvate-kinase | 65,9 | 46,4 | 36,9 | 41,7 ± 6,3 |
| lactico-déshydrogénase | 410 | 290,3 | 268,0 | 270 ± 36,7 |
| glucose-6-phosphate-déshydrogénase | 6,9 | 8,7 | 16,2 | 17,1 ± 2,3 |
| 6-phospho-gluconate-déshydrogénase | 12,3 | 11,1 | 10,3 | 7,7 ± 2,3 |
| glutathion-réductase | 22,8 | 13,7 | 9,7 | 11,7 ± 2,3 |
| magnésium-ATPase | 30,4 | 30,9 | 29,9 | 33,1 ± 3,8 |

L'activité enzymatique est exprimée en Unités Internationales, c'est-à-dire le nombre de µM de substrat consommées par minute à 25°C et à pH 7,5 par $10^{11}$ érythrocytes.

Outre les activités enzymatiques, le diagnostic de déficit de type hétérozygote est confirmé par la recherche des corps de Heinz, l'étude du glutathion réduit et le test de stabilité du glutathion réduit. Les valeurs sont en effet fortement abaissées chez la mère et l'enfant, alors qu'elles sont normales chez le père (tableau XIV).

Tableau XIV

| | C... Philippe | C... mère | C... père | Valeurs normales |
|---|---|---|---|---|
| ATP en µM/$10^{11}$ érythrocytes | 14,2 | 14,9 | 12,5 | 16 ± 2,0 |
| Glutathion réduit | 13,0 | 13,8 | 15,3 | 21 ± 3,3 |
| Test de Beutler | -42,3 % | -38,9 % | -18 % | -15,9 ± 6,4 |
| Recherche des corps de Heinz | 48 % | 33 % | 4 % | 0 - 28 % |

D'après LÖHR, le taux de glucose-6-phosphate-déshydrogénase et de certains autres enzymes est relativement élevé pour un enfant hétérozygote. Il explique ce phénomène par le fait que ce dernier possède encore une quantité non négligeable d'hématies foetales plus riches en équipement enzymatique que les hématies adultes.

L'étiologie de l'anémie étant identifiée, le traitement est simple, puisqu'il repose simplement sur un régime thérapeu-

tique et diététique. En effet, l'enfant n'a plus présenté depuis, de signes d'hémolyse, grâce à une information correcte des parents. Ainsi la liste des médicaments à proscrire s'allonge sans cesse. Les principaux produits responsables sont notamment l'atébrine, les dérivés de l'aniline et de la quinine, la phénacétine, la phénothiazine, la phénylhydrazine, les salicylates, les dérivés de la naphtoquinone en particulier la vitamine $K_1$ hydrosoluble, les sulfonamides, le chloramphénicol, les fungicides, le nitrofurane, le bleu de méthylène, les dérivés de l'hydantoïne... Quant à l'alimentation, il suffit d'éviter certaines légumineuses dont les plus dangereuses engendrent le favisme bien connu par les peuples vivant autour du bassin méditerranéen.

## Chapitre II

## ÉTUDE D'UN CAS DE DÉFICIT PASSAGER EN GLUCOSE-6-PHOSPHATE-DÉSHYDROGÉNASE

### OBSERVATION.

L'enfant A... Mohamed est né le 12 janvier 1968, postmature de 15 jours et en état de mort apparente à la suite d'une grande extraction sous anesthésie générale. A la naissance, il présente une asphyxie bleue. Son poids est de 3 500 g . Le foie et la rate ne sont pas augmentés de volume. Après 24 heures, la bilirubine atteint 160 mg p.mille et au bout de 48 heures, elle est de 250 mg p.mille, nécessitant une exsanguino-transfusion. On a alors incriminé une hémolyse d'origine immunologique par incompatibilité B/O. L'hémogramme est normal : globules rouges 4 200 000, hémoglobine 82 p.cent, globules blancs 7 500.

Formule sanguine :

polynucléaires neutrophiles ... 66 p.cent
polynucléaires éosinophiles ... 6
lymphocytes ..... 14
monocytes ..... 14
érythroblastes acidophiles .... 2

L'exploration des enzymes du globule rouge donne les résultats suivants (tableaux XV et XVI) :

Tableau XV

| Enzymes | A... Mohamed | Valeurs normales |
|---|---|---|
| G6PD | 0,90 | 1,50 ± 0,30 |
| 6PGD | 0,40 | 0,80 ± 0,20 |
| PK | 1,90 | 2,25 ± 0,25 |
| Glut.réd. | 1,50 | 0,80 ± 0,20 |

Nos résultats sont exprimés en U.I., c'est-à-dire le nombre de µM de substrat consommé/min et/ml de globules rouges.

Tableau XVI

| Enzymes | | A... Mohamed | Valeurs normales |
|---|---|---|---|
| Mg+Mg-Na-K-ATPase | $H_2O$ | 2 | 1,9 à 2,6 |
| | saponine | 8,4 | 8 à 10 |
| Mg-ATPase | $H_2O$ | 0,87 | 1,3 à 1,9 |
| | saponine | 6,0 | 6,5 à 8 |

Nos résultats sont exprimés en U.I.,c'est-à-dire de µM de phosphore libéré en 1 heure à pH 7,6 par ml de stromas et à 37°C.

Les mêmes déterminations effectuées cinq semaines plus tard, puis au bout de quatre mois, n'ont plus présenté la moindre anomalie (tableau XVII).

Tableau XVII

Valeurs obtenues chez A... Mohamed après cinq semaines.

| Enzymes | | A... Mohamed | Valeurs normales |
|---|---|---|---|
| G6PD | | 1,40 | 1,50 ± 0,30 |
| 6PGD | | 0,70 | 0,80 ± 0,20 |
| PK | | 1,90 | 2,25 ± 0,25 |
| LDH | | 16,00 | 22,0 ± 3,00 |
| Glut.réd. | | 1,16 | 0,80 ± 0,20 |
| Mg+Mg-Na-K-Atpase | $H_2O$ | 3,1 | 1,9 à 2,6 |
| | saponine | 7,7 | 8 à 10 |
| Mg-ATPase | $H_2O$ | 2,3 | 1,3 à 1,9 |
| | saponine | 6,2 | 6,5 à 8,0 |

DISCUSSION.

Cet exemple illustre ici encore le cas typique de l'immaturité enzymatique passagère du nourrisson, puisque l'anémie s'est réparée spontanément. Cependant, l'interrogatoire de la mère a révélé une prise massive de 20 comprimés d'Aspro à la fin du cinquième mois de sa grossesse. N'y aurait-il donc pas eu sensibilisation des globules de l'enfant ? Là encore le diagnostic de certitude entre l'incompatibilité B/O et l'enzymopathie est à confirmer.

## Chapitre III

## ÉTUDE D'UN CAS DE FAVISME

OBSERVATION.

L'enfant R... Martin, né le 23 juin 1963, est admis au Service de Pédiatrie des Hospices Civils de Strasbourg, le 28 août 1964 dans un état subcomateux, accompagné d'adynamie et d'hypotonie. Il présente en outre une pâleur extrême accompagnée d'un ictère intense. Le coeur est très rapide, le foie dépasse le rebord costal de deux travers de doigts. Il en est de même pour la rate. Par contre, on ne relève aucune adénopathie. On note un purpura au niveau du front. A son hospitalisation, l'image sanguine est la suivante : globules rouges 1 300 000, hémoglobine 28 p.cent, globules blancs 31 200.

Formule sanguine :

| | |
|---|---|
| polynucléaires neutrophiles ... | 58 p.cent |
| polynucléaires éosinophiles ... | 2 |
| lymphocytes ..... | 37 |
| monocytes ..... | 3 |
| normoblastes polychromatophiles | 2 |

très forte anisochromie, anisocytose et microsphérocytose.

La prise de sang ramène un sang noir totalement hémolysé. Le dosage de la bilirubine est impossible.

Le 29 août 1964, on transfuse 220 ml de sang total. L'hémogramme devient alors : globules rouges 3 000 000, hémoglobine 51 p.cent, globules blancs 8 600.

Formule sanguine :

| | |
|---|---|
| polynucléaires neutrophiles ... | 27 p.cent |
| polynucléaires basophiles ..... | 1 |
| polynucléaires éosinophiles ... | 8 |
| lymphocytes ..... | 57 |
| monocytes ..... | 7 |

On relève toujours la présence d'une importante anisocytose, poïkilocytose, anisochromie; apparition de quelques elliptocytes et cellules-cibles.

On pratique une nouvelle transfusion de 65 ml le 31 août 1964. L'image sanguine étudiée le 4 septembre 1964 se normalise : globules rouges 3 060 000, hémoglobine 63 p.cent, globules blancs 6 600.

Formule sanguine :

| | |
|---|---|
| polynucléaires neutrophiles ... | 43 p.cent |
| polynucléaires éosinophiles ... | 5 |
| lymphocytes ..... | 46 |
| monocytes ..... | 5 |
| plasmocytes ..... | 1 |

Enfin, le 15 septembre 1964 on procède à la dernière transfusion : 150 ml de sang total. Le 16 septembre, l'hémogramme est normal : globules rouges 4 350 000, hémoglobine 90 p.cent, globules blancs 6 600.

Formule sanguine :

| | |
|---|---|
| polynucléaires neutrophiles ... | 43 p.cent |
| polynucléaires basophiles ..... | 2 |
| polynucléaires éosinophiles ... | 6 |
| lymphocytes ..... | 45 |
| monocytes ..... | 4 |

La détermination de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase demandée à deux reprises, du fait de l'origine italienne de l'individu a révélé des taux enzymatiques fortement diminués à savoir 0,32 UI et 0,50 UI par ml d'hématies, contre 1,40 UI , effectué le même jour chez un sujet sain.

DISCUSSION.

C'est le récit de la mère de l'enfant qui permit de poser le diagnostic exact. Il s'agit en effet d'une famille originaire d'Ortrato, petite localité du Sud de l'Italie. La maladie a débuté 24 heures après l'absorption de fèves que les parents avaient rapporté avec eux et planté dans leur jardin. Cet aliment constituait de temps en temps le repas familial. On n'a jamais relevé d'antécédent hémolytique dans la famille composée du père, de la mère, de trois filles âgées de 14 ans, 11 ans et 5 ans, d'un fils âgé de 13 ans et de Martin âgé de 1 an.

La mère raconte que son grand-père et l'un de ses frères sont aussi atteints de favisme. En effet, le lendemain du repas, ces collatéraux font de l'anoxie, de la température et les urines sont foncées dues à l'hémoglobinurie avec ou sans hématurie.

Dans la famille du père, on n'a jamais relevé d'antécédent de ce genre. Il s'agit donc ici d'un cas typique de sensibilisation des globules rouges par une substance toxique encore inconnue, présente dans les fèves, et répandue autour du bassin méditerranéen, en particulier en Sardaigne, en Italie du Sud, en Grèce et en Turquie.

## Chapitre IV

## ÉTUDE D'UN CAS D'ANÉMIE HÉMOLYTIQUE AVEC HYPERACTIVITÉ ENZYMATIQUE

OBSERVATION.

L'enfant P... Isabelle est née prématurément au septième mois, le 14 novembre 1964. Elle est hospitalisée pendant deux mois en puériculture pour bronchite sans température. A l'âge de 1 an, elle est admise en Clinique Infantile aux Hospices Civils de Strasbourg. Elle présente alors un syndrome infectieux avec anémie grave et épisode convulsif s'étant accompagné d'une hémiparésie gauche transitoire.

L'évolution a été favorable après traitement antibiotique, calmants et transfusions.

Les recherches virales et bactériologiques sont toutes restées négatives. A l'électroencéphalogramme, il existe un foyer lent à droite. A l'auscultation il existe une hépatomégalie de deux travers de doigts et la pointe de la rate est perceptible.

L'hémogramme est alors le suivant : globules rouges 1 400 000, réticulocytes 26 p.mille, hémoglobine 16 p.cent, globules blancs 28 000, plaquettes 235 000.

Formule sanguine :

| | |
|---|---|
| polynucléaires neutrophiles .... | 54 p.cent |
| polynucléaires éosinophiles .... | 1 |
| lymphocytes ..... | 32 |
| monocytes ..... | 13 |
| érythroblastes basophiles ..... | 2 |
| érythroblastes acidophiles ..... | 3 |

anisocytose, anisochromie, poïkilocytose considérable, présence de très nombreux anulocytes.

La recherche d'auto-agglutinines et d'iso-agglutinines froides et chaudes ainsi que la recherche d'hémolysines est restée négative.

La détermination des enzymes du globule rouge, donne des résultats particulièrement élevés. Plusieurs dosages sur le même prélèvement et à plusieurs jours d'intervalle, nous donnent les résultats (cf. tableau XVIII).

A l'examen de sortie, on ne relève pas de séquelles neurologiques, et l'enfant est en bon état général.

Tableau XVIII

| | 7.12.65 | 8.12 | 10.12 | 14.12 | 17.12 | 18.12 | 20.12 | Valeurs normales |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| G6PD | 6,91 | 4,64 | 3,22 | 1,45 | 0,90 | 0,73 | 0,45 | 1,50 ± 0,30 |
| PK | 9,65 | 5,80 | 4,92 | 2,88 | 1,81 | 0,80 | 0,48 | 2,25 ± 0,25 |

DISCUSSION.

Dans cette affection, la cause de l'hémolyse n'est pas liée à un déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase et en pyruvate-kinase du globule rouge. Cependant elle mérite une mention spéciale, car c'est le type même de la crise hémolytique intense avec régénération globulaire intense. Les valeurs spectaculaires de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase et de la pyruvate-kinase sont le témoignage d'une population érythrocytaire très jeune à métabolisme hyperactif, et il eut été intéressant de pouvoir mener une exploration plus complète.

## Chapitre V

# ÉTUDE D'UN CAS D'ANÉMIE HÉMOLYTIQUE D'ÉTIOLOGIE INCONNUE

Nous étudions ici le cas d'une anémie hémolytique par déficit en 6-phospho-gluconate-déshydrogénase, qui fit l'objet de la thèse de Monsieur Paul HEIDT, en vue de l'obtention du grade de Docteur en Médecine, publiée par LAUSECKER, HARTLEYB et LÖHR (172) dans les Archives Françaises de Pédiatrie et rapportée par ces auteurs au 70e Congrès "der deutschen Gesellschaft für innere Medizin" à Wiesbaden.

OBSERVATION.

L'enfant H... Alex, né le 20 juillet 1962 est admis immédiatement au Service des Prématurés de l'Hôpital Louis Pasteur à Colmar.

L'examen clinique, à part une discrète pâleur, ne présente aucune particularité. On ne note pas d'hépato-splénomégalie. Par contre, l'examen hématologique de routine à la naissance, montre des anomalies manifestes :

- anémie : hématies 3 300 000, hémoglobine 12,8 p.cent
- érythroblastose considérable : 65 000 érythroblastes pour 80 000 cellules nucléées.

Le groupe sanguin est du type O, Rhésus négatif; le test de Coombs direct est négatif. A la sixième heure apparaît un ictère avec une bilirubine libre de 130 mg par litre, nécessitant une exsanguino-transfusion. A la suite de l'échange, la bilirubine totale n'atteint plus que 57 mg par litre. L'hémogramme s'est amélioré : globules rouges 4 100 000, cellules nucléées 24 400 dont deux érythroblastes pour un leucocyte. Par la suite, l'ictère et l'érythroblastose se normalisent; l'enfant quitte le Service à l'âge de cinq semaine. L'hémogramme est normal et il ne subsiste plus ni subictère, ni anémie. L'étiologie de cette hémolyse néo-natale brutale ne peut être expliquée.

L'enquête immuno-hématologique effectuée au Centre de Transfusion Sanguine de Strasbourg (Professeur WAITZ) est négative : la mère et l'enfant sont du même groupe O, M, N, Rhésus négatif cddee; absence d'agglutinines irrégulières dans le sérum de la mère en présence des hématies de son enfant et d'hématies témoins.

Evolution ultérieure.

L'enfant est réadmis à l'âge de 2 mois et demi pour une anémie avec subictère conjonctival sans gros foie, ni grosse rate.

Ce subictère amène à reprendre les investigations et à rechercher les rapports qui pourraient le relier à l'hémolyse néo-natale. Le syndrome est celui d'une anémie hémolytique.

- anémie : globules rouges 2 000 000, hémoglobine 6,4 g p.cent. La formule ne présente pas de particularités. On relève deux érythroblastes pour 100 leucocytes. Anisocytose, poïkilocytose. Absence de sphérocytes.

- hémolyse : bilirubine libre 26 mg par litre, fer sérique 151 δ p.cent, réticulocytose 21,6 p.cent témoignant une activité médullaire accrue. Le myélogramme ne montre pas d'altérations des lignées granulocytaires et mégacaryocytaires. Par contre, il existe une nette réaction érythrocytaire avec prédominance d'érythroblastes acidophiles. La détermination de la durée de vie moyenne des hématies a été réalisée au Centre Paul Strauss (Professeur CHEVALLIER), selon la méthode de marquage au $Cr_{51}$ (technique de Gray et Sterling). La demi-vie des hématies de l'enfant n'est que de 21 jours, contre 28 jours pour la normale.

Les résultats de ces examens permettent de conclure à l'existence d'un syndrome hémolytique, dont les manifestations remontent à la naissance et caractérisées par :

- l'anémie
- l'hyperbilirubinémie indirecte
- l'augmentation du fer sérique
- l'hyperréticulocytose
- la réduction de la durée de vie des hématies
- la réaction érythroblastique.

Les recherches étiologiques demeurent cependant infructueuses :

- il y a en effet absence de microsphérocytose, allongement de la zone d'hémolyse : hémolyse initiale 4 g p.mille, hémolyse totale 1,5 g p.mille de NaCl.

- les épreuves d'hémolyse après incubation à 37°C sont normales et identiques à un témoin sain du même âge. La recherche d'hémoglobine anormale réalisée à l'Institut de Biologie de l'Hôpital Cochin à Paris par le Docteur De TRAVERSE s'est avérée négative. En outre, il y a absence d'auto-anticorps chauds, absence d'agglutinines froides et d'hémolysine biphasique de Donath et Landsteiner.

- l'étude hématologique du père et de la mère n'a pas apporté de résultat positif.

En raison de la difficulté du diagnostic, ces examens ont été refaits à l'âge de 18 mois, mais ils n'ont pas apporté d'élément nouveau. C'est pourquoi ces auteurs ont été amenés à évoquer une anémie hémolytique par déficit enzymatique.

Examens orientant vers un déficit enzymatique :

- test de Beutler à l'acétylphénylhydrazine : 55 p.cent des hématies renferment plus de 5 corps de Heinz, les valeurs normales étant inférieures à 23 p.cent.

- recherche d'un déficit enzymatique : les dosages pratiqués à deux reprises par le Docteur LÖHR à la Clinique Médicale Universitaire de Tübingen, ont montré les anomalies biochimiques suivantes :

1° Diminution et instabilité du glutathion réduit.

2° Diminution importante de l'ATP érythrocytaire : selon LÖHR, cette diminution n'est pas entièrement à mettre sur le compte des délais de transport, puisque les dosages sur un sang témoin acheminé dans les mêmes conditions que celui du malade, ont donné des valeurs de 14 ± 2 µM contre 16 ± 2 µM pour un sang prélevé sur place.

3° Diminution de la 6-phosphogluconate-déshydrogénase.

4° Diminution du triphospho-pyridine-nucléotide réduit $NADPH_2$.

5° Diminution du diphospho-pyridine-nucléotide NAD.

Tous les résultats sont groupés dans les tableaux XIX et XX.

Tableau XIX

Détermination des intermédiaires de la glycolyse chez H... Alex.

| Enzymes | H... Alex | Valeurs normales |
|---|---|---|
| Hexokinase | 2,2 | 1,7 ± 0,25 |
| Phosphoglucomutase | 9,2 | 7,0 ± 0,8 |
| Phospho-hexose-isomérase | 94,6 | 89,0 ± 7,0 |
| Phospho-fructo-kinase | 15,7 | 17,7 ± 2,2 |
| Aldolase | 5,0 | 5,0 ± 0,5 |
| Triose-phospho-isomérase | 864,0 | 628,0 ± 96,0 |
| Glycéraldéhyde-1-phosphate-déshydrogénase | 0 | 0 |
| Glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase | 432,0 | 413,0 ± 51,0 |
| Phosphoglycérate-kinase | 493,0 | 512,0 ± 59,1 |
| Phosphoglycérate-isomérase | 61,7 | 75,2 ± 10,9 |
| Enolase | 36,6 | 37,5 ± 3,7 |

Tableau XIX (suite)

| Enzymes | H... Alex | Valeurs normales |
|---|---|---|
| Pyruvate-kinase | 47,1 | 41,7 ± 6,30 |
| Lactico-déshydrogénase | 317,0 | 270 ± 36,7 |
| Glucose-6-phosphate-déshydrogénase | 19,7 | 17,1 ± 2,3 |
| 6-phosphogluconate-déshydrogénase | 2,3 et 4,9 | 7,7 ± 08 |
| Glutathion-réductase | 9,1 | 9,7 ± 1,3 |
| Méthémoglobine-réductase à $NADPH_2$ | 2,6 | 2,4 ± 0,2 |
| Méthémoglobine-réductase à $NADH_2$ | 6,0 | - |
| Malate-déshydrogénase | 173,2 | 244,0 ± 36,2 |
| Phosphatase acide | 7,0 | 9,9 ± 0,6 |
| Phosphatase alcaline | 0 | 0 |
| Adénylate-kinase | 459,0 | 423,1 ± 85,0 |
| Magnésium-ATPase | 41,8 | 33,1 ± 3,8 |
| Créatinine phosphokinase | 0 | 0 |
| G.O.-transaminase | 7,6 | 7,7 ± 1,0 |
| G.T.-transaminase | 1,0 | 0 |
| Glutamate-déshydrogénase | 0 | 0 |
| Alcool-déshydrogénase | 0 | 0 |

Les résultats sont exprimés en Unités Internationales.

U.I. = nombre de µM de substrats consommés par minute par $10^{11}$ érythrocytes à 25°C et à pH 7,5.

Tableau XX

Détermination des coenzymes de la glycolyse chez H... Alex.

| Coenzymes | H... Alex | Valeurs normales |
|---|---|---|
| ATP | 9,7 | 16,0 ± 2,0 |
| ADP | 2,5 | 3,0 ± 0,4 |
| AMP | 4,9 | 2,1 ± 0,2 |
| Glutathion réduit GSH | 3,6 | 8,7 ± 1,3 |
| Glutathion oxydé GSSG | 1,3 | 2,2 ± 0,6 |
| Test de Beutler de stabilité du glutathion | - 63 % | - 15,9 ± 6,4 |
| Formation de corps de Heinz après incubation à l'acétylphénylhydrazine | + 51 % | 0 - 28 % |
| NAD (DPN) | 0,3 | 0,7 ± 0,1 |
| $NADH_2$ ($DPNH_2$) | 0,06 | 0,08 ± 0,02 |
| NADP (TPN) | 0,5 | 0,3 ± 0,1 |
| $NADPH_2$ ($TPNH_2$) | 0,4 | 0,9 ± 0,3 |
| Formation de lactate/heure | 21,3 | 38,4 ± 5,9 |

Les résultats sont exprimés en µM pour $10^{11}$ érythrocytes.

Durant ces deux années, l'évolution de l'affection a été simple : l'enfant présente constamment un syndrcme anémique avec un chiffre d'érythrocytes voisin de 2 500 000. On note toujours un subictère conjonctival, sans gros foie, ni grosse rate. Il n'a reçu que quelques rares transfusions. Un essai de traitement par la prednisone à doses dégressives durant un mois, n'a entraîné aucune modification hématologique. La maladie ayant débuté par une hémolyse intense avec ictère dans les heures qui suivirent la naissance, les examens complémentaires invoquant une cause immunologique, une anomalie de l'hémoglobine, la sphérocytose constitutionnelle n'ayant abouti à aucun résultat positif, les auteurs concluent à un déficit congénital en 6-phosphogluconate-déshydrogénase, d'autant plus, que ce trouble métabolique est confirmé par le test de Beutler, la diminution du glutathion réduit, de l'ATP, des nucléotides pyridiniques et par la durée de vie raccourcie des globules rouges marqués au $Cr_{51}$.

Pendant près de deux années, l'enfant ne sera plus soumis à aucun contrôle, ni biologique, ni biochimique, les parents ayant refusé que soit refait un nouveau bilan. Cependant, son état restera inchangé avec toujours les mêmes signes de subictère et d'anémie chronique compris entre 2 000 000 et 3 000 000 de globules rouges.

Suite aux travaux effectués dans notre laboratoire de biochimie de la Clinique Médicale A de Strasbourg, dirigé par les Professeurs WARTER et MÉTAIS, l'étude de ce cas, homologué comme déficit en 6-phosphogluconate-déshydrogénase, prendra une orientation nouvelle à partir du mois de février 1966. A cette époque, l'enfant âgé de trois ans et demi est réhospitalisé. Il présente toujours les mêmes symptômes cliniques à savoir l'anémie accompagnée d'ictère. Il s'agit à présent d'une anémie chronique avec pâleur, asthénie, retard staturo-pondéral. Le faciès mongoloïde est typiquement celui d'une anémie de Cooley et pourrait de ce fait être confondue avec une thalassémie majeure. La radiographie montre l'aspect très net du crâne dit en "poil de brosse" avec épaississement de la diploé (figure 21). Avant de procéder à toute transfusion, il nous est demandé une confirmation des déterminations enzymatiques.

Les résultats sont les suivants (cf. tableau XXI) :

Tableau XXI

| Enzymes | H... Alex | Valeurs normales |
|---|---|---|
| G6PD | 2,16 | 1,50 ± 0,30 |
| 6PGD | 1,29 | 1,0 ± 0,20 |
| PK | 2,25 | 2,25 ± 0,25 |
| LDH | 20,88 (2.300 u.w.) | 22 ± 3 (2000 u.w.) |

Nos résultats sont exprimés en Unités Internationales/ml d'hématies.

A notre grande surprise, l'activité de la 6-phosphogluconate-déshydrogénase est normale et il nous est impossible d'y donner toute explication. Le 18 mars 1966, nous demandons un second prélèvement. Le sujet est en pleine crise d'hémolyse avec 2 400 000 globules rouges. Nous obtenons alors 2,06 UI pour la glucose-6-phosphate-déshydrogénase et dans cinq dosages successifs de la 6-phosphogluconate-déshydrogénase : 1,03 ; 0,79 ; 0,86 ; 0,75 ; 0,86 UI. Les résultats ne peuvent donc plus être considérés comme des erreurs de techniques ou de manipulations.

Entre temps, nous obtenons confirmation des résultats de LÖHR et WALLER (Clinique Médicale Universitaire de Tübingen). En plus de H... Alex, ceux-ci ont pu comparer les valeurs des deux soeurs Claudette et Laure, que nous reproduisons dans le tableau XXII :

Tableau XXII

| Enzymes | Alex | Claudette | Laure | Valeurs normales |
|---|---|---|---|---|
| Hexokinase | 3,2 | 0,9 | 1,5 | 1,7 ± 0,3 |
| G6PD | 24,7 | 15,2 | 20,4 | 18 ± 3,6 |
| 6PGD | 8,6 | 6,2 | 6,4 | 5,9 ± 1,0 |
| Glutathion-réductase | 11,6 | 14,6 | 21,0 | 11,7 ± 2,3 |
| ATP | 22 | 16,4 | 26,1 | 20,0 |
| GSH | 25 | 29,8 | 33,0 | 21 ± 3,3 |
| Test de Beutler | 15 % | 16,5 % | 21,5 % | jusqu'à 25 % |
| Formation des corps de Heinz (érythrocytes comprenant plus de 4 corps de Heinz) | 5 % | 3 % | 37 % | jusqu'à 10 % |

Le 29 mars, nous envisageons l'exploration du sang de moelle, obtenu par ponction sternale, afin d'écarter toute hypothèse de destruction accélérée des globules carencés dans la circulation générale, celle-ci pouvant être éventuellement due à une fragilisation extrême des cellules ou à un facteur encore inconnu. Malheureusement celle-ci nous apporte pas d'explication nouvelle (tableau XXIII) :

Tableau XXIII

| Enzymes | Sang de moelle | Sang périphérique |
|---|---|---|
| G6PD | 2,52 | 1,89 |
| 6PGD | 1,47 | 1,17 |
| PK | 8,19 | 2,35 |
| LDH | 26,3 (2.717 u.w.) | 23,6 (2.550 u.w.) |
| Glutathion-réductase | 1,65 | 1,05 |

Les résultats sont exprimés en Unités Internationales par ml d'hématies.

Au mois de novembre 1963, FILDES et PARR (175) décrivent pour la première fois l'électrophorèse en gel d'amidon, permettant une séparation des différents isozymes de la 6-phosphogluconate-déshydrogénase. Nous envisageons alors la possibilité d'un génotype enzymatique anormal. C'est la raison pour laquelle nous entreprenons cette étude avec la collaboration de ces auteurs au London Hospital Medical College. L'électrophorèse est pratiquée contre deux témoins normaux : d'une part un enfant témoin D... Marie, âgée de trois ans présentant une activité de 1,65 UI pour la glucose-6-phosphate-déshydrogénase et de 0,84 UI pour la 6-phosphogluconate-déshydrogénase, d'autre part, une laborantine du laboratoire de biochimie de Londres : D.H... Eileen, dont le génotype enzymatique connu est du type "Common Variant" rencontré chez 4 p.cent des individus seulement. Si le génotype de notre propositus est relativement rare, puisqu'il est du type "Common Variant" présentant deux bandes sombres et une bande claire, il ne présente aucun caractère pathologique (figure 22)

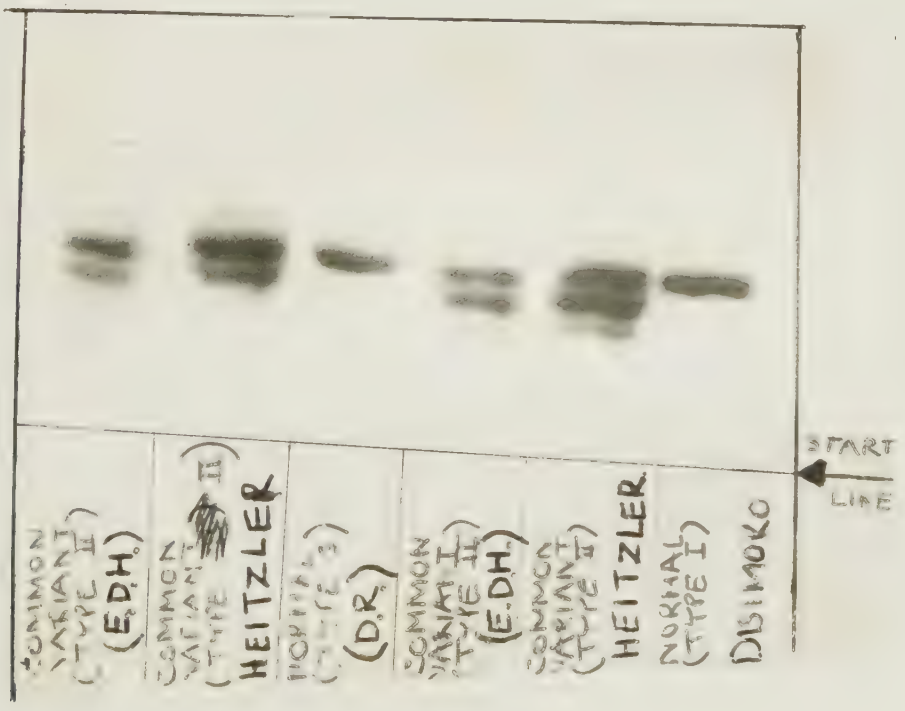



Fig. 22 - Isozymes de la 6PGD chez H... Alex.

Toute exploration des enzymes intraglobulaires étant demeurée infructueuse et aucune explication plausible n'ayant pu être donnée à cette affection, nous poursuivons nos investigations à partir du mois de février 1968 sur une voie différente. A cette époque notre patient présente toujours son anémie chronique avec des poussées d'hémolyse qu'on répare provisoirement par des transfusions. Nous essayons alors d'expliquer l'étiologie, en nous adressant cette fois au stroma globulaire. C'est en effet l'étude de l'ionogramme plasmatique et érythrocytaire qui devait attirer notre attention sur l'existence d'un trouble du transport des ions sodium et potassium. En effet, les valeurs à un mois d'intervalle sont les suivantes (tableau XXIV) :

Tableau XXIV

| | Plasma | | Globules rouges | |
|---|---|---|---|---|
| | $Na^+$ | $K^+$ | $Na^+$ | $K^+$ |
| 5.2.1968 | 141,5 mEq/litre | 7,0 mEq/litre | 36,8 mEq/litre | 79,5 mEq/litre |
| 5.3.1968 | 106,5 | 5,7 | 44,8 | 85,3 |
| Normales | 140 | 4,6 | 20 | 100 |

Il est frappant de constater l'inversion des résultats, c'est-à-dire l'augmentation du potassium avec diminution du sodium plasmatique d'une part, et l'augmentation du sodium avec diminution du potassium intraglobulaire d'autre part. Il ne fait donc aucun doute que nous sommes en présence d'un trouble du transport actif des ions. Ce phénomène expliquerait donc déjà la cause de l'hémolyse. Sur ces données, il est donc logique d'explorer l'enzyme responsable de ce phénomène : il s'agit de l'ATPase présent dans le stroma, le donneur d'énergie étant l'ATP qui sera dégradé en ADP. Deux déterminations pratiquées sur les deux mêmes prélèvements, à un mois d'intervalle, nous montrent les anomalies que nous rapportons dans les tableaux XXV et XXVI :

Tableau XXV

| | | Sang périphérique | | Sang de moelle | Valeurs normales de sang périphérique |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 5.2.1968 | 7.2.1968 | 5.2.1968 | |
| Mg+Mg-Na-K-ATPase | $H_2O$ | 6,45 | 19,68 | 20,32 | 1,9 à 2,6 |
| | Saponine | 10,96 | 26,13 | 33,55 | 8 à 10 |
| Mg-ATPase | $H_2O$ | 0,96 | 13,87 | 16,13 | 1,3 à 1,9 |
| | Saponine | 17,42 | 17,42 | 24,84 | 6,5 à 8,0 |

Tableau XXVI

| Enzymes | | Sang périphérique | | Valeurs normales |
|---|---|---|---|---|
| | | 5.3.1968 | 7.3.1968 | |
| Mg+Mg-Na-K-ATPase | $H_2O$ | 7,74 | 12,58 | 1,9 à 2,6 |
| | Saponine | 19,67 | 17,42 | 8 à 10 |
| Mg-ATPase | $H_2O$ | 6,13 | 8,06 | 1,3 à 1,9 |
| | Saponine | 16,45 | 16,45 | 6,5 à 8,0 |

Nos résultats sont exprimés en Unités Internationales par ml de stromas, c'est-à-dire le nombre de µM de phosphore libérées par hydroloyse à 37°C pendant 1 heure et à pH 7,6.

On conclut d'emblée à l'augmentation très importante de l'activité ATPasique. Les enzymes étudiés jusqu'alors, demeurent toujours à leurs valeurs physiologiques (tableau XXVII) :

Tableau XXVII

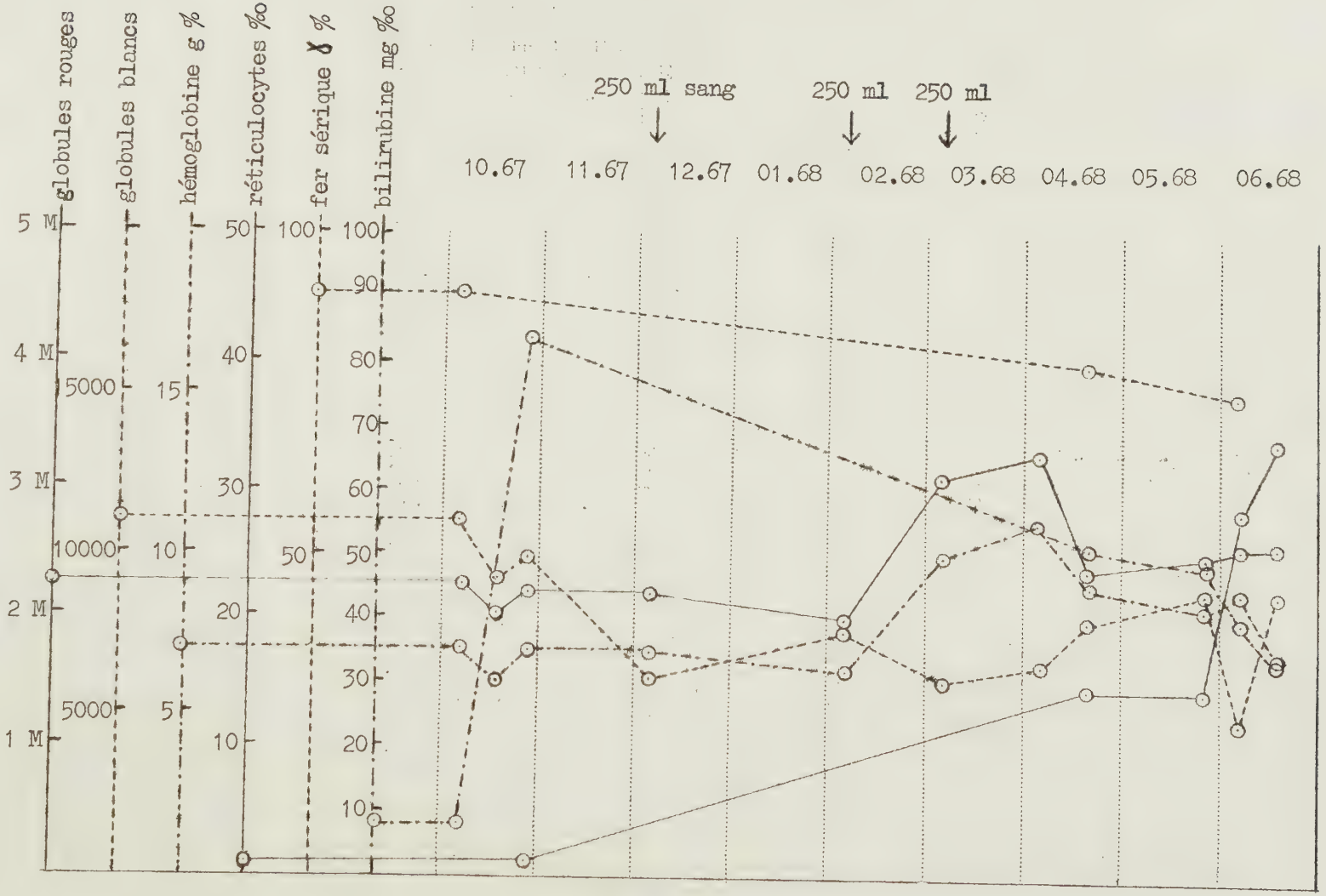
| Enzymes | 5.2.1968 | | 5.3.1968 | Valeurs normales de sang périphérique |
|---|---|---|---|---|
| | Sang périphérique | Sang de moelle | Sang périphérique | |
| G6PD | 2,0 | 2,86 | 1,77 | 1,50 ± 0,30 |
| 6PGD | 1,0 | 1,80 | 0,92 | 0,80 ± 0,20 |
| PK | 1,50 | 2,00 | 1,77 | 2,25 ± 0,25 |
| Glut.réd. | 0,70 | 1,00 | 0,92 | 0,80 ± 0,20 |
| LDH | 16,40 (1.700 u.w.) | 16,90 (1.823 u.w.) | 19,30 (2.380 u.w.) | 22 ± 3 (2.000 u.w.) |

Nos résultats sont exprimés en Unités Internationales par ml de globules rouges.

Enfin les examens biologiques pratiqués en juillet 1968, tout comme ceux effectués antérieurement, n'apportent pas d'éléments nouveaux. En effet :

- hémogramme : les chiffres des hématies, des leucocytes, de l'hémoglobine, des réticulocytes, du fer sérique, de la bilirubine, contrôlés périodiquement, sont rapportés sur le graphique (figure 23).

Fig. 23 - Evolution de l'hémogramme chez H... Alex



Le dernier bilan donne les résultats suivants :

globules rouges 2 600 000, globules blancs 7 300, hémoglobine 6 g p.cent, hématocrite 24 p.cent, réticulocytes 141 p.mille, anisocytose, anisochromie.

Formule sanguine :

| | |
|---|---|
| polynucléaires neutrophiles .... | 48 p.cent |
| polynucléaires éosinophiles .... | 7 |
| polynucléaires basophiles ..... | 1 |
| lymphocytes ..... | 42 |
| monocytes ..... | 2 |

La recherche d'une hémoglobine anormale est restée négative.

L'électrophorèse plasmatique est normale.

La résistance à l'hémolyse a donné les résultats suivants :

• mai 1968 :

| | |
|---|---|
| hémolyse initiale ..... | 4,08 g p.mille |
| hémolyse totale ..... | 2,08 g |

• juin 1968 :

| | |
|---|---|
| hémolyse initiale ..... | 5,00 g p.mille |
| hémolyse totale ..... | 3,40 g |

- examens isotopiques (Centre Paul Strauss - Strasbourg) :

Décroissance irrégulière de l'activité après marquage au $Cr_{51}$. Il existe plusieurs paliers. La période globale de la courbe se situe à 13 jours. Clearance plasmatique du fer : sidérémie 58 γ p.cent/ml de sérum; période de disparition plasmatique : 10 minutes; volume plasmatique 1 452 ml . Transfert du fer pour 100 ml de plasma et par jour 5,8 mg donc 84,21 mg pour la totalité du plasma.

La période de disparition du fer est très nettement raccourcie : 10 minutes au lieu de 60 à 100 minutes normalement. Malgré une sidérémie basse, le transfert quotidien du fer est de 84 mg ce qui est considérablement augmenté.

Epreuve de séquestration splénique : on ne remarque aucune concentration élective du chrome dans la rate au cours de l'épreuve.

A l'heure actuelle il persiste une anémie chronique entre 2 000 000 et 3 000 000 de globules rouges avec des poussées se traduisant par un ictère d'intensité moyenne avec bilirubine indirecte comprise entre 50 et 100 mg p.mille.

DISCUSSION.

Les résultats décrits durant quatre années consécutives sont bien contradictoires. D'abord étiquetée comme déficit en 6PGD, cette anémie n'est pas de ce type. Mais pour quelles raisons les valeurs de l'enzyme se sont-elles subitement normalisées ? LÖHR et WALLER n'ont à ce jour pu donner d'explication. Cependant, il s'agit bien d'une maladie corpusculaire liée à une anomalie de l'érythrocyte. Les nombreux travaux effectués dans le domaine de l'enzymologie du globule rouge au cours des cinq dernières années, nous permettent aujourd'hui d'émettre un certain nombre d'hypothèses que nous envisagerons successivement.

1°) Interaction d'une NADPase du stroma avec la 6PGD, décrite : en 1967 par Franco AJMAR, Barbara SCHARRER et coll.(174) :

La première question qu'on doit se poser en étudiant cette affection, se résume comme suit : pourquoi les auteurs trouvent-ils un déficit en 6PGD à la naissance, alors que toutes les déterminations ultérieures effectuées aussi bien dans notre laboratoire, que dans celui du Professeur LÖHR à Tübingen et que celui du Professeur PARR à Londres ne peuvent plus mettre en évidence cette anomalie ? Cette carence enzymatique n'aurait-elle donc jamais existée ?

S'il est possible d'exclure une erreur de technique ou une perte de l'activité enzymatique due au transport, l'évolution de l'affection n'en demeure pas moins curieuse. En effet, parmi tous les cas rapportés à ce jour de déficience en 6PGD aussi bien par BEUTLER que par l'école de Londres, aucun auteur ne mentionne l'existence d'un syndrome hémolytique et ce trouble est classé parmi les déficiences enzymatiques sans manifestation clinique. Comme nous l'avons vu dans la première partie de l'exposé, il existe plusieurs isozymes de la 6PGD de faible activité, mais qui permettent malgré tout une vie normale de l'individu sans présenter la moindre perturbation hématologique. De ce point de vue donc, l'étiologie proposée par LAUSECKER, HARTLEYB et LÖHR, paraît contradictoire.

Il est cependant possible de donner une explication à ce phénomène. Il existe en effet dans le stroma globulaire de l'adulte une NADPase qui fait normalement défaut chez le nourrisson et qui a une action inhibitrice vis-à-vis de la 6PGD. Cette action est particulièrement accusée sous la forme d'un produit de dégradation du NADP, le 2'-phospho-adénosine-phospho-ribose qui modifie aussi bien la structure que l'activité enzymatique. Il serait donc possible d'invoquer l'existence d'une activité NADPasique très fortement accrue à la naissance de l'enfant, activité qui se serait normalisée avec l'âge et qui aurait engendrée cette situation de pseudo-déficience en 6PGD.

S'il est possible de donner une explication à l'erreur d'interprétation de ce syndrome, il est indispensable d'en préciser l'origine, la cause exacte.

2°) Existence d'une variété anormale de 6PGD :

Récemment plusieurs auteurs se sont attachés à l'étude cinétique des enzymes de la glycolyse. Malgré une activité normale, certains de ces enzymes sont responsables de troubles cliniques et biochimiques. Ces phénomènes ont pu être observés avec la G6PD type Madrona (223) et dernièrement avec une variante de pyruvate-kinase décrite par PAGLIA, VALENTINE et coll. (50). Le trouble trouverait son origine dans la synthèse protéique. L'agent en cause résiderait dans la mutation d'un gène de structure qui entrainerait la substitution d'un acide aminé de la copule protéique, ce qui aurait pour conséquence le changement du tracé électrophorétique, la perturbation de la Constante de Michaëlis vis-à-vis de son substrat, la variation du pH optimum d'activité, l'augmentation ou la diminution de la stabilité de l'enzyme vis-à-vis de la chaleur, etc... Tous ces arguments pourraient s'appliquer au cas de la 6PGD.

3°) Etude de l'ATPase du stroma :

Parmi tous les enzymes érythrocytaires que nous avons étudiés, l'ATPase est le seul qui présente vraiment une anomalie. S'il n'est pas question de déficience, l'augmentation en est tellement importante qu'elle mérite une discussion, d'autant plus que la perturbation ionique est manifeste.Cette augmentation n'est pas relevée par LÖHR et coll. Cependant, leurs résultats concordent avec les nôtres, puisqu'ils trouvent une Mg-ATPase à 41,8 unités contre 33,1 ± 3,8 pour la normale. N'y aurait-il donc pas une relation entre l'anomalie de répartition des ions et l'activité ATPasique ? Nous rejoignons ici les hypothèses formulées dans l'étude de l'anémie de Von Jaksch Luzet.

Pour expliquer cet état de fait, nous pourrions invoquer une fois de plus l'existence d'un isoenzyme pathologique présentant une cinétique aberrante et en particulier une Constante de Michaëlis anormale vis-à-vis de son substrat, l'ATP. Mais il pourrait aussi s'agir d'une anomalie de structure du stroma globulaire. Cet argument s'explique déjà par le fait que les déterminations de l'ATPase voient leurs valeurs nettement élevées par la seule incubation en présence d'eau. L'enzyme ne se trouverait donc peut-être pas à l'emplacement qu'il occupe normalement. La microscopie électronique nous montre en effet l'ATPase dans les couches profondes du stroma. La couche externe lipidique est fonction de la taille et de l'âge du

globule rouge. Celui-ci est incapable de faire la synthèse de ces composés lipidiques et il maintient son homéostase en procédant à l'échange continuel des lipides plasmatiques à savoir le cholestérol, la phosphatidyl-choline, la sphingomyéline. En outre, d'après le schéma donné par WHITTAM (188), le sac érythrocytaire est parsemé de pores, à travers lesquelles l'eau, les chlorures et les bicarbonates diffusent rapidement. Cette migration est facilitée par l'existence de charges positives disposées tout le long de ces ouvertures. Par contre, les cations $Na^+$ et $K^+$ ne passent que difficilement ces orifices et leur échange est sous la dépendance directe d'une "pompe" localisée dans la membrane. La plus active, représentée pour 70 p.cent par l'ATPase, utilise l'ATP, grâce à ses liaisons riches en énergie. L'augmentation de l'activité ATPasique pourrait donc être la conséquence directe du déséquilibre existant entre les ions, l'enzyme essayant de compenser l'altération du stroma en rétablissant le rapport $Na^+/K^+$ à l'intérieur du globule. Mais l'augmentation de l'activité ATPasique devrait théoriquement entraîner une chute de l'ATP qui devrait elle-même être compensée par une augmentation de la glycolyse anaérobie. Si LÖHR trouve bien l'ATP à 9,7 $\mu M/10^{11}$ érythrocytes dans sa première détermination, il en trouve 22 à la seconde. Par contre, certains enzymes de la glycolyse dont l'hexokinase, la phosphoglucomutase, la triose-phosphate-isomérase, la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, présentent une activité accrue, argument en faveur d'une régénération de l'ATP consommé par suite de l'hyperfonctionnement de la "pompe à sodium". Si on relève donc une perturbation de l'ATPase, il n'est pas possible de l'incriminer dans la cause de l'hémolyse et celle-ci serait plutôt due à une altération morphologique, physiologique ou chimique du stroma globulaire.

4°) Etude comparative d'un cas d'anémie hémolytique associée à une baisse de l'ATP érythrocytaire décrit par MILLS, LEVIN et ALPERIN (222) :

Ces auteurs décrivent un syndrome hémolytique analogue à celui dont nous rapportons l'observation. Nous rappelons ici les signes essentiels et qui correspondent bien aux symptômes que nous décrivons.

Il s'agit d'un enfant de 10 mois, hospitalisé pour une infection des voies respiratoires supérieures avec anémie hémolytique. En plus, ce sujet présente une importante splénomégalie et la splénectomie est pratiquée à l'âge de 18 mois. Les globules rouges de ce sujet sont caractérisés par une glycolyse élevée en particulier la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, la 6-phosphogluconate-déshydrogénase, la glutathion-réductase, l'énolase et l'adénine-phosphoribosyl-transférase, qui présentent des

valeurs nettement supérieures à la normale. Nous sommes frappés par l'analogie quant à l'ATPase des hématies du malade qui montrent une activité double de celle rencontrée chez des sujets sains. La durée de vie de ces hématies est abaissée à 4 jours au lieu de 25 à 30 jours normalement. Le bilan des nucléotides est résumé dans le tableau XXVIII.

Tableau XXVIII

| | Etude de MILLS | | Déterminations de LÖHR et coll. | |
|---|---|---|---|---|
| | c.w. | Valeurs normales | H... Alex | Valeurs normales |
| AMP | 3,0 | 2,4 | 4,9 | 2,1 |
| ADP | 22,5 | 20,1 | 2,5 | 3,0 |
| ATP | 104 | 139 | 9,7 | 16 |
| AMP+ADP+ATP | 131 | 162 | 17,1 | 21,1 |
| ADP/ATP | 0,21 | 0,15 | 0,25 | 0,18 |
| NAD | 8,6 | 6,7 | 0,3 | 0,7 |
| NADP | 6,8 | 4,6 | 0,5 | 0,3 |

Les résultats de MILLS sont exprimés en µM pour 100 ml de globules rouges.
Les résultats de LÖHR sont exprimés en µM pour $10^{11}$ érythrocytes.

Ici aussi, nous sommes frappés par l'analogie existant entre les deux observations.

Un troisième cas similaire fut rapporté en 1964 par GRIMES, MEISLER et DACIE (224). Ces auteurs décrivent un sujet présentant une anémie hémolytique intense avec corps de Heinz, une glycolyse très élevée et une quantité basse d'ATP érythrocytaire. Chaque auteur essaie de donner une explication à cette hémolyse. Pour JACOB, BRAIN et DACIE (225), les corps de Heinz se fixeraient au stroma, altérant ainsi ses propriétés physiques. Pour d'autres, l'hémolyse serait due à l'utilisation excessive de l'ATP par le globule rouge entraînant une fragilisation de la membrane, bien que la cause exacte en soit inconnue. Plus récemment, on a incriminé l'existence d'une hémoglobine, d'un enzyme ou d'une autre protéine anormale dont le mécanisme de la synthèse n'est que peu connu, mais dont l'information génétique est probablement contenue dans le DNA de la cellule souche du globule rouge. Il n'est donc pas surprenant de constater que bon nombre d'anémies hémolytiques congénitales ne peuvent être rattachées à une hémoglobine anormale ou à une carence enzymatique. En effet, la structure des composés protéiniques ou non protéiniques du stroma globulaire peut aussi être sujet à des modifications qui sont à la base des anomalies physiologiques et physico-chimiques de la cellu-

le, telles le transport actif ou le transfert passif des ions ou d'autres molécules. Dans certains cas, les altérations métaboliques pourraient compenser l'anomalie de la membrane et la durée de vie de la cellule est pratiquement normale. Dans d'autres cas, le mécanisme compensateur apparaît inefficace et le globule verra son métabolisme se dégrader et il aboutira à une mort précoce.

Les arguments et les suppositions ne manquent pas, mais il est souvent impossible de donner une explication précise de bon nombre d'anémies hémolytiques. L'exploration du métabolisme du globule rouge en est à ses débuts et la mise en évidence de ses anomalies demandera encore la mise au point de techniques analytiques plus précises, plus sensibles et plus spécifiques que celles qui ont été utilisées à ce jour.

## Chapitre VI

## ÉTUDE D'UN CAS D'ANÉMIE DE VON JAKSCH LUZET HAYEM

OBSERVATION.

L'enfant C... Anne Marie, né le 30 août 1967, est admis au Service de Pédiatrie de l'Hôpital Louis Pasteur à Colmar, le 7 mars 1968 pour bronchite asthmatiforme. Ce diagnostic est confirmé à l'examen d'entrée. On note en outre un rachitisme floride, une splénomégalie de trois travers de doigt associée à une hépatomégalie de deux travers de doigt. Il n'y a pas d'adénopathie périphérique palpable.

Hémogramme :

Les examens de routine nous donnent : globules rouges 3 000 000, hémoglobine 8,4 g p.cent, globules blancs 21 000, plaquettes 160 000, réticulocytes 4 p.cent, bilirubine indirecte 15 mg par litre, vitesse de sédimentation 46,90, hématocrite 24 p.cent.

Formule sanguine :

| | |
|---|---|
| polynucléaires neutrophiles .... | 22 p.cent |
| lymphocytes ..... | 65 |
| monocytés ..... | 2 |
| plasmocytes ..... | 3 |
| blastes ..... | 3 |
| myélocytes ..... | 5 |
| érythroblastes ..... | 10 pour 100 leucocytes |

anisocytose, anisochromie, polychromatophilie.

Résistance à l'hémolyse :

| | |
|---|---|
| hémolyse initiale ... | 5,0 g p.mille de NaCl |
| hémolyse totale ..... | 3,8 g p.mille. |

Electrophorèse de l'hémoglobine normale.

Fer sérique 77 γ p.cent ml de sérum, calcium sanguin 59 mg p. mille, phosphatases alcalines 14 unités Bodansky.

Examens immunologiques, effectués au Centre de Transfusion Sanguine de Strasbourg par le Docteur RODIER :

- test de Coombs direct à 4°C et à 37°C : négatif en présence d'antiglobulines polyvalentes.

- recherche d'anticorps irréguliers dans le sérum en présence d'auto-hématies et d'iso-hématies O, CcDEe, MN, Ss,

$P_1$, $P_2$, Kk, Kp (a+b+), Jk (a+b+), Le (a+b+), Lu (a+b+), Fy (a+b+).

- recherche en milieu salin négative, recherche en milieu albumineux négative, test de Coombs indirect négatif, recherche en présence d'hématies papaïnées négative, recherche en présence d'hématies bromélinées négative.

- recherche d'hémolysines dans le sérum en présence d'iso-hématies négative, en présence d'auto-hématies papaïnées faiblement positive.

On note la même réaction des hématies de l'enfant dans un sérum normal.

La fragilité globulaire pourrait s'expliquer par le fait que les recherches n'ont pu être faites sur du sang frais.

Ponctions :

Les ponctions sternale, tibiale et de la crête iliaque ne ramènent aucun matériel exploitable. On se décide alors à la biopsie chirurgicale de la rate et du plateau tibial.

Rate : elle est hyperactive. Il n'y subsiste que quelques rares follicules lymphoïdes. L'hématopoïèse y est nette. On y rencontre tous les éléments de la lignée rouge, mégacaryocytes inclus. La coloration de la réticuline montre une structure normale permettant d'exclure une leucose. Absence de signes de surcharge. On confirme donc l'hématopoïèse extra-osseuse.

Moelle : nombreux mégacaryocytes et grande quantité de cellules éosinophiles. On retrouve des cellules matricielles de la lignée blanche et rouge ainsi que des granulocytes hypermatures. En outre, importante fibrose.

Evolution ultérieure :

- Après trois semaines, l'anémie s'aggrave : myélémie 11 p. cent avec persistance d'une érythroblastose périphérique. Le nombre de globules rouges s'abaisse à 2 000 000 avec une hémoglobine à 6 g p.cent. L'hématocrite est à 18 p.cent. Réticulocytes 6,5 p.cent, plaquettes 120 000.

Des accidents de coagulation sévères surviennent en période post-opératoire. La prothrombine est alors de 100 p.cent, la consommation de la prothrombine est normale, le temps de Howell est de 2 min 25 (témoin 1 min 40). Le test de lyse des euglobulines de Von Kaulla est normal. Le traitement nécessite des perfusions de sang frais deux fois par jour.

- Après un mois, l'hémogramme est le suivant :

globules rouges 1 800 000, hémoglobine 6,2 g p.cent, globules blancs 42 400.

Formule sanguine :

| | | |
|---|---|---|
| polynucléaires neutrophiles .... | 44 | p.cent |
| polynucléaires éosinophiles .... | 1 | |
| polynucléaires basophiles ..... | 0 | |
| lymphocytes ..... | 50 | |
| myélocytes ..... | 3 | |
| blastes ..... | 2 | |
| érythroblastes ..... | 7 | pour 100 leucocytes |

Une mesure de la durée de vie des hématies est effectuée au Centre Paul Strauss dans le Service du Docteur METHLIN. On observe une courbe de décroissance de la radioactivité sanguine avec pente initiale rapide, peut-être due à une fragilisation globulaire au cours du marquage. La pente se redresse ensuite, mais la destruction globulaire reste nette, supérieure à la normale avec une période de disparition du $Cr_{51}$ de 14 jours contre 27 à 30 jours pour la normale.

Clearance et taux de transfert du $Fe_{59}$ : sidérémie 200 p.cent ml de sérum; période de disparition plasmatique 50 minutes; volume plasmatique 298 ml . Taux de transfert du fer : 4 mg pour 100 ml et par jour, soit 11,92 mg pour la totalité du plasma et par jour. Captation du $Fe_{59}$ : absence de concentration dans le sacrum; pente ascendante dans le foie et la rate.

L'hématopoïèse extramédullaire se trouve donc confirmée.

Le traitement est mis en route le 25 avril : on administre 900 000 U de vitamine D en un mois. Pendant les 15 jours qui suivent, on pratique des transfusions pour réparer l'anémie qui se situe à 2 400 000 globules rouges, hémoglobine 8,4 g p.cent, globules blancs 14 600, blastes 1, myélocytes 2, érythroblastes 5 pour 100 leucocytes.

Au bout de trois semaines, l'anémie se répare : globules rouges 3 500 000 puis 4 000 000, réticulocytes 7 p.cent puis 12 p.cent. Le rachitisme s'améliore, les phosphatases alcalines s'abaissent à 5 unités Bodansky. Apparition de noyaux d'ossification au poignet. Le foie retrouve son volume normal, la splénomégalie diminue de façon importante, mais la rate reste encore nettement palpable.

Les trois mois suivant cette thérapeutique, l'évolution est la suivante :

- en juin 1968 : globules rouges 3 800 000, hémoglobine 11 g p.cent, globules blancs 12 500.

Formule sanguine :

| | |
|---|---|
| polynucléaires neutrophiles .... | 39 p.cent |
| polynucléaires éosinophiles .... | 2 |
| lymphocytes ..... | 55 |
| monocytes ..... | 3 |
| myélocytes ..... | 1 |

Hématocrite 35 p.cent, plaquettes 210 000, réticulocytes 22 p. mille, fer sérique 85 γ p.cent ml de sérum.

- en juillet 1968 : globules rouges 4 600 000, hémoglobine 12 g p.cent, globules blancs 10 000.

Formule sanguine :

| | |
|---|---|
| polynucléaires neutrophiles .... | 30 p.cent |
| lymphocytes ..... | 67 |
| monocytes ..... | 3 |

Il y a absence de formes jeunes.

Le traitement par la vitamine D est poursuivi à raison d' une ampoule d'Auxergyl $D_3$ per os deux fois par mois.

- en août 1968 : globules rouges 4 100 000, hémoglobine 12,3 g p.cent, globules blancs 9 500, fer sérique 108 γ p.cent ml de sérum.

Formule sanguine :

| | |
|---|---|
| polynucléaires neutrophiles .... | 26 p.cent |
| polynucléaires éosinophiles .... | 2 |
| lymphocytes ..... | 68 |
| monocytes ..... | 1 |
| plasmocytes ..... | 3 |

Survie globulaire : la période de disparition du $Cr_{51}$ est de 25 jours. Celle-ci s'est donc normalisée.

Clearance plasmatique du Fe59 : 54 minutes; volume plasmatique 609 ml , sidérémie 108 γ p.cent ml de sérum. Transfert du fer : 2 mg pour 100 ml de plasma soit 12,18 mg pour la totalité du plasma. Les résultats sont donc à considérer comme normaux.

Incorporation du Fe59 dans les organes hématopoïétiques : excellente concentration du fer dans le sacrum. Diminution lente de l'activité splénique et hépatique, correspondant à une diminution de l'activité sanguine. Il s'agit là de courbes très différentes de celles d'il y a cinq mois montrant en particulier la normalisation de l'activité hématopoïétique du sacrum.

- en septembre 1968, le tableau clinique et hématologique s' est normalisé. En effet, les dernières investigations ont donné les résultats suivants :

globules rouges 3 900 000, hémoglobine 12 g p.cent, globules blancs 10 800.

Formule sanguine :

| | |
|---|---|
| polynucléaires neutrophiles .... | 48 p.cent |
| lymphocytes ..... | 47 |
| monocytes ..... | 4 |
| plasmocytes ..... | 1 |

Réticulocytes 18 p.mille, hématocrite 35 p.cent, fer sérique 120 γ p.cent ml de sérum, bilan phospho-calcique normal.

La ponction sternale ramène un matériel très riche. Le myélogramme est le suivant :

| | |
|---|---|
| blastes ..... | 7 p.cent |
| promyélocytes ..... | 11 |
| myélocytes ..... | 23 |
| polynucléaires neutrophiles .... | 29 |
| lymphocytes ..... | 17 |
| monocytes ..... | 0 |
| plasmocytes ..... | 0 |
| mégaloblastes ..... | 0 |
| proérythroblastes ..... | 1 |
| érythroblastes ..... | 12 |
| mégacaryocytes ..... | + |

Légère hyperplasie de la lignée granulocytaire.

Cliniquement l'enfant va bien. Les signes cliniques, biologiques et radiologiques du rachitisme ont disparu. La formule sanguine se maintient depuis 4 mois sans transfusion. Il persiste cependant une rate modérément augmentée de volume.

DISCUSSION.

Les anémies rachitiques et le syndrome de Von Jaksch Luzet ont été l'objet, depuis les travaux d'ORSINI (226), d'études approfondies et réalisent aujourd'hui une véritable entité nosologique avec une individualité physiopathologique bien précise. C'est la raison pour laquelle nous avons porté un intérêt particulier à ce cas d'anémie et nous avons poussé nos investigations au maximum. Cependant, si ce type d'anémie est bien caractérisé, l'étiopathologie n'en reste pas moins inconnue et nous avons tenté d'y apporter quelque solution.

L'étude biologique et hématologique fait ressortir l'existence d'une anémie hypochrome associée à un rachitisme. A cette anémie s'associe une hépato-splénomégalie conséquence de l'érytropoïèse hépato-splénique, une hypoplasie médullaire, une réaction myélo-proliférative avec apparition dans la circulation de

myélocytes et d'érythroblastes réalisant le tableau symptomatique du syndrome de Von Jaksch Luzet.

L'étude approfondie des auto-anticorps restée négative, nous permet de rejeter l'origine immunologique de cette affection. En outre, aucune augmentation de la captation splénique n'ayant été mise en évidence, nous pouvons éliminer la cause d'un hypersplénisme hémolytique. La nature extracorpusculaire de cette hémolyse peut donc être rejetée. Celle-ci est démontrée par les récents travaux d'ORSINI. Ce dernier a mesuré simultanément dans deux cas, d'une part la durée de vie des hématies d'enfants marquées au radio-fer, d'autre part la durée de vie d'hématies saines marquées au radiochrome et injectées à ces mêmes enfants. Alors que les premières avaient une durée de vie très raccourcie, les hématies du donneur possédaient une survie presque normale.

Comparant nos résultats à ceux de KISSIN, COTTE et coll. (227), nous avons effectué le bilan enzymatique des hématies de notre malade. Nous avons réalisé au mois d'avril, deux séries de dosages successifs à 8 jours d'intervalle. Nos résultats se résument dans les tableaux XXIX et XXX.

Tableau XXIX

| | 11.4.1968 | 19.4.1968 | Valeurs normales |
|---|---|---|---|
| G6PD | 2,23 | 2,05 | 1,50 ± 0,30 |
| 6PGD | 0,95 | 0,97 | 1,0 ± 0,20 |
| PK | 2,30 | 2,60 | 2,25 ± 0,25 |
| Glut.réd. | 0,85 | 0,68 | 1,0 ± 0,20 |
| LDH | 21,10 soit 2.150 u.w. | 19,00 soit 1.950 u.w. | 22 ± 3 ou 2.000 u.w. |

Nos résultats sont exprimés en Unités Internationales par ml d'hématies.

Tableau XXX

| | Mg+Na-K-Mg-ATPase | | Mg-ATPase | |
|---|---|---|---|---|
| | $H_2O$ | Saponine | $H_2O$ | Saponine |
| 11.4.1968 | 13,55 | 20 | 10,5 | 16,9 |
| 19.4.1968 | 11,3 | 20,3 | 7,1 | 19,7 |
| Valeurs normales | 1,9 à 2,6 | 8 à 10 | 1,3 à 1,9 | 6,5 à 8 |

Nos résultats sont exprimés en Unités Internationales par ml de stromas, c'est-à-dire le nombre de µM de phosphore libérées par hydrolyse à 37°C pendant 1 heure et à pH 7,6.

Peut-être en relation avec les résultats anormaux de l'ATPase, nous notons une diminution considérable de l'ATP, dont les valeurs respectives trouvées lors de deux déterminations sont de 0,37 UI et 0,34 UI par ml de culot globulaire soit 13 mg et 12 mg d'ATP pour 100 ml d'hématies, les valeurs normales étant de 1,4 à 1,6 UI soit 30 à 50 mg d'ATP pour 100 ml d'hématies.

Comme on peut donc le constater, il n'existe aucune déficience enzymatique; bien au contraire, on note une légère augmentation de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, témoin d'une régénération médullaire active. Cependant, fait curieux, le taux de l'ATPase localisée au niveau du stroma érythrocytaire présente une activité très élevée, entrainant une chute considérable de l'ATP, source d'énergie dans le transfert actif des ions $Na^+$ et $K^+$. Alors qu'à l'état physiologique on ne dévoile vraiment l'enzyme qu'après traitement des stromas par un agent tensio-actif telle la saponine, nous obtenons déjà une activité nettement supérieure à la normale après simple traitement des membranes par l'eau bidistillée qui ne modifie en rien leur structure. N'y aurait-il donc pas là déjà un signe révélateur d'une anomalie de la configuration et de la structure lipoprotéique du stroma globulaire ? Ou n'aurions-nous pas à faire à une variété enzymatique anormale avec une Constante de Michaëlis modifiée vis-à-vis du substrat comme HOOK, STAMATOYANNOPOULOS et coll. (223) l'ont récemment montré pour une nouvelle variante de glucose-6-phosphate-déshydrogénase qu'ils nomment G6PD type Madrona ?

KISSIN, COTTE et coll. (227) étudiant les douze enzymes de la voie d'Embden Meyerhof, deux enzymes du shunt de Dickens Horecker, deux enzymes vestiges du cycle de Krebs, la magnésium-ATPase, la myokinase et la glutathion-réductase chez sept sujets atteints de syndrome de Von Jaksch Luzet, rapportent les résultats publiés dans le tableau XXXI.

Ces auteurs insistent sur une nette élévation de certains enzymes, en particulier l'hexokinase, l'aldolase, la phosphoglycéromutase, l'énolase, la pyruvate-kinase, la glucose-6-phosphate-déshydrogénase et l'isocitrate-déshydrogénase. Cette augmentation n'est pas constante et elle est à mettre sur le compte d'une population érythrocytaire jeune par conséquent d'activité enzymatique maxima. Il est cependant intéressant d'étudier ce tableau plus en détail et on est frappé par l'élévation d'autres enzymes telle la Mg-ATPase dont ceux-ci ne font pas mention. Si cette augmentation n'apparaît pas chez les sept sujets étudiés, elle existe sûrement chez B... Chabanne. Elle est à la limite supérieure de la normale chez B... Salem et G... François, si on tient compte qu'il s'agit de dosages enzymatiques. On peut donc affirmer que ce phénomène atteint

Tableau XXXI

Bilan enzymatique globulaire chez 7 syndromes de Von Jaksch Luzet (KISSIN et coll.(227)).

| Enzymes | Valeurs normales | G... François | B... Didier | R... Malicène | I... Jimenez | S... Nordin | B... Chabanne | B... Salem |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hexokinase | 2,2 ± 0,85 | 5 | 2,3 | 2,5 | 4,2 | 8,2 | 2,5 | 3 |
| Phosphoglucomutase | 5 ± 1,7 | 7,3 | 4,7 | 3,8 | 5 | 5,5 | 5 | 3 |
| Glucose-phosphate-isomérase | 99 ± 17 | 101 | 81 | 110 | 141 | 95 | 90 | 105 |
| Fructose-6-phosphate-kinase | 18,5 ± 5 | 19,5 | 9 | 16 | 31,5 | 19 | 10 | 23,5 |
| Diphospho-fructaldolase | 7 ± 2 | 11,5 | 9 | 13,5 | 8 | 5,5 | 17 | 11,5 |
| Glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase | 342 ± 95 | 487 | 301 | - | 555 | 443 | 532 | 460 |
| 3-phospho-glycéro-kinase | 554 ± 115 | 685 | 510 | 323 | 630 | 427 | 810 | 570 |
| Phospho-glycéro-mutase | 41 ± 14 | 77 | 52 | 67 | 40 | 27 | 98 | 90 |
| Enolase | 38 ± 10 | 62 | 36 | 43 | 80 | 38 | 61 | 47 |
| Pyruvate-kinase | 43 ± 15 | 46 | 56 | 100 | 96 | 65 | 65 | 45 |
| Lactico-déshydrogénase | 278 ± 85 | 430 | 140 | 110 | 336 | 322 | 149 | 305 |
| Glucose-6-phosphate-déshydrogénase | 15,9 ± 3 | 26 | 23 | 14 | 43 | 33 | 30 | 20 |
| 6-phospho-gluconate-déshydrogénase | 12 ± 4 | 21 | 10 | 10 | 18 | 22 | 8 | 19 |
| Glutathion-réductase | 14 ± 4 | 14 | 12 | 23 | 16 | 8 | 15 | 12 |
| Isocitrate-déshydrogénase | 2,5 ± 1,1 | 2,6 | 4 | 7 | 2,7 | 4 | 4 | 4 |
| Malate-déshydrogénase | 332 ± 98 | 573 | 309 | 425 | 435 | 296 | 356 | 300 |
| Myokinase | 383 ± 164 | 487 | 585 | 327 | 395 | 283 | 534 | 434 |
| Magnésium-ATPase | 58 ± 13 | 70 | 45 | 65 | 56 | 44 | 81 | 69 |

Les résultats sont exprimés en Unités Internationales $10^{11}$ érythrocytes.
1 unité internationale = 1 µM de substrat transformée/minute à 25°C et à pH 7,5.

un sujet sur deux. En ce qui nous concerne, nous sommes en faveur d'un trouble de nature corpusculaire, soit dû à l'apparition d'un isoenzyme pathologique de l'ATPase qui perturberait le transport actif des ions à travers la membrane, soit dû à une anomalie de la structure du stroma entraînant cette perturbation de l'activité enzymatique, comme pour tenter de rétablir le rapport sodium/potassium de la cellule. Cette hypothèse s'appuie sur l'étude de l'ionogramme plasmatique et globulaire (tableau XXXII).

Tableau XXXII

| | Plasma | | Globules rouges | |
|---|---|---|---|---|
| | $Na^+$ | $K^+$ | $Na^+$ | $K^+$ |
| 11.4.1968 | 150 mEq | 5,4 mEq | 52 mEq | 82 mEq |
| 19.4.1968 | 148 | 5,6 | 46,6 | 93 |
| Valeurs normales | 140 | 4,1 à 5,1 | 20 à 25 | 95 à 100 |

Les résultats sont flagrants : il y a une inversion du quotient $Na^+/K^+$, le $Na^+$ pénétrant massivement dans la cellule, alors que le $K^+$ y est bas, ce qui expliquerait la fragilité du globule et sa durée de vie abaissée à 14 jours comme le montre l'étude aux isotopes.

La nature corpusculaire de l'affection n'est pratiquement plus à mettre en doute, mais l'étiopathologie exacte n'en demeure pas moins obscure et de nombreux travaux sont encore à faire. Ne pourrait-on pas incriminer le rôle direct, ou par l'intermédiaire du calcium, de la vitamine D dans le maintient ou l'élaboration de la structure de la membrane du globule rouge ?

## Chapitre VII

## ÉTUDE D'UN CAS DE MÉTHÉMOGLOBINÉMIE CONGÉNITALE PASSAGÈRE PAR CARENCE EN DIAPHORASE

### OBSERVATION.

L'enfant M... Emile, né le 27 avril 1968, est admis pour dyspepsie à l'âge de 19 jours au Service de Pédiatrie de l'Hôpital Louis Pasteur à Colmar. A l'examen d'entrée, on est frappé par le cyanose généralisée d'une teinte spéciale gris-ardoisée n'augmentant pas au moment des cris. L'examen clinique et radiologique du coeur est normal, de même que l'électrocardiogramme.

Hémogramme : globules rouges 4 500 000, hémoglobine 17,2 g p.cent, globules blancs 5 300, hématocrite 40 p.cent.

Formule sanguine :

| | |
|---|---|
| polynucléaires neutrophiles .... | 28 p.cent |
| polynucléaires éosinophiles .... | 10 |
| polynucléaires basophiles ..... | 1 |
| lymphocytes ..... | 56 |
| monocytes ..... | 5 |

Les électrolytes sanguins sont normaux. La coproculture est positive au staphylocoque. La recherche des nitrites administrés dans la soupe de carotte, le thé et le sérum glucosé, est restée négative.

La recherche de la méthémoglobine s'est avérée positive avec une méthémoglobinémie de 27 p.cent déterminée par la méthode de Evelyn et Malloy. Comme traitement, on pratique une injection unique de 0,75 g de bleu de méthylène. On constate la disparition définitive de la cyanose et de la méthémoglobine au 8e jour. La recherche de la méthémoglobine est restée négative après trois semaines et aucune suite n'est apparue.

### DISCUSSION.

Les causes des méthémoglobinémies congénitales relèvent de deux origines : soit l'apparition d'une hémoglobine M anormale, soit de la carence en diaphorase $NADH_2$ dépendante entraînant une perturbation dans la réduction de l'hémoglobine.

Les dosages des enzymes de la glycolyse donnent des résultats normaux, ainsi que le montrent les tableaux XXXIII et XXXIV.

Tableau XXXIII

| | M... Emile | Valeurs normales |
|---|---|---|
| G6PD | 2,27 | 1,50 ± 0,30 |
| 6PGD | 1,25 | 0,80 ± 0,20 |
| PK | 2,61 | 2,25 ± 0,25 |
| Glut.réd. | 1,17 | 0,80 ± 0,20 |
| LDH | 19,88 (2.000 u.w.) | 22 ± 3 (2.000 u.w.) |
| ATP | 1,37 (28 mg %) | 1,4 à 1,6 (30 à 50 mg %) |

Nos résultats sont exprimés en Unités Internationales/ml d'hématies.

Tableau XXXIV

| | Na-K-Mg-ATPase | | Mg-ATPase | |
|---|---|---|---|---|
| | $H_2O$ | Saponine | $H_2O$ | Saponine |
| M... Emile | 3,6 | 12,6 | 2,1 | 10,3 |
| Valeurs normales | 1,9 à 2,6 | 8 à 10 | 1,3 à 1,9 | 6,5 à 8,0 |

Nos résultats sont exprimés en µM de phosphore libérées/heure/ml de stromas à 37°C et à pH 7,6.

Deux déterminations à 8 jours d'intervalle ont montré un abaissement considérable de l'activité diaphorasique. Les résultats sont les suivants (figure 24).

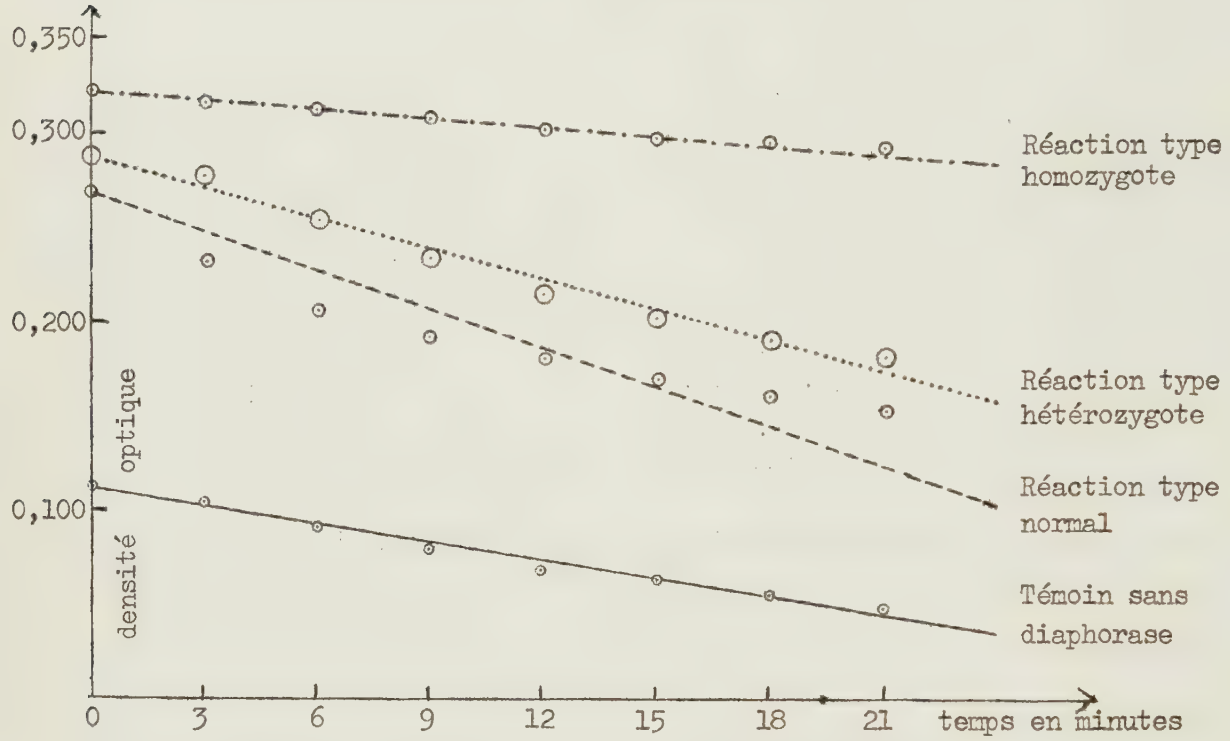



Fig. 24 - Détermination de la diaphorase chez M... Emile.

- le 24 mai 1968 : $- 1,8 \cdot 10^{-3}$ Δ O.D./min/mg métHb.
- le 30 mai 1968 : $+ 2,1 \cdot 10^{-3}$ Δ O.D./min/mg métHb.
- le 1 juin 1968 : $+ 1,8 \cdot 10^{-3}$ Δ O.D./min/mg métHb.

Rappelons les valeurs normales. Elles se situent entre - 1 et + 5 . $10^{-3}$ Δ O.D. pour le sujet homozygote, entre 15 et 30 . $10^{-3}$ Δ O.D. pour le sujet hétérozygote et supérieures à 30 . $10^{-3}$ Δ O.D. pour le sujet normal. L'anomalie est flagrante sur la courbe de décroissance de la densité optique en fonction du temps d'incubation. Chez le sujet homozygote la droite de décroissance due à l'enzyme est parallèle à celle du témoin, alors que chez le sujet hétérozygote et à fortiori chez le sujet sain, la décroissance due à la diaphorase est beaucoup plus rapide que celle du témoin ainsi que le montre notre graphique. Les deux droites ont donc tendance à se recouper.

Nous n'avons plus effectué de détermination par la suite et l'enfant ne souffre plus d'aucun trouble. Alors que les en-

zymes de la glycolyse atteignent des valeurs élevées à la naissance, la diaphorase présente une activité peu développée et il en est ainsi dans notre étude. Le premier dosage est caractéristique de la déficience du type homozygote, ainsi que le second qui montre cependant une récupération d'activité certaine. On en déduit donc une récupération tendant à la normalisation de l'activité diaphorasique. Ces cas typiques d'immaturité enzymatique transitoire chez le nouveau-né ont été rapportés maintes fois dans la littérature, mais leur cause véritable n'a pas encore été élucidée.

# C O N C L U S I O N S

Les enzymopathies érythrocytaires relèvent d'un groupe d'affections bien définies. Tributaires des récentes découvertes de l'enzymologie et grâce à leurs caractères cliniques, génétiques et biochimiques, ces maladies constituent aujourd'hui une classe nouvelle de la pathologie du globule rouge.

Cependant, il subsiste encore de nombreuses incertitudes. En effet, si l'on connaît à peu près bien la transmission génétique, les propriétés physiques, chimiques, électrophorétiques de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, il en est pas de même des autres enzymes du métabolisme glucidique et à fortiori des réductases et des enzymes du stroma dont la mise en évidence ne remonte qu'à quelques années seulement. En effet, l'étude de nombreux enzymes s'est trouvée grandement facilitée par la mise à la disposition des biologistes, de substrats et d'enzymes nécessaires aux techniques enzymologiques. Mais l'étude d'un déficit enzymatique reste soumise à des difficultés théoriques et pratiques qui en limitent l'extension et ces déterminations ne peuvent être pratiquées couramment à l'heure actuelle que dans des laboratoires spécialisés. L'utilisation de systèmes de réaction complexes, pose quantités de problèmes théoriques : les enzymes utilisés dans les réactions secondaires ne sont pas nécessairement dans les conditions optimales de pH, de concentration ionique et de température. Des difficultés pratiques naissent de l'irrégularité de la qualité des substrats et des enzymes fournis par les firmes commerciales. D'une marque à l'autre, d'un lot de fabrication à l'autre, des différences peuvent exister entraînant des variations des normalités. De minimes différences de techniques portant par exemple sur la concentration des substrats ou des coenzymes, modifient les résultats. L'ensemble de ces faits est un obstacle à la comparaison des normalités obtenues d'un laboratoire à un autre, et chacun se doit d'établir les siennes.

Les anomalies enzymatiques du globule rouge voient leur nombre augmenter rapidement en fonction de l'extension des possibilités des dosages d'enzymes. Pour chaque déficit découvert, l'évolution des recherches suit un processus identique : il aboutit à l'isolement de l'enzyme et à la détermination d'une part des caractéristiques de l'activité enzymatique et d'autre part des propriétés physico-chimiques de la protéine qui en est le support. Ainsi peuvent être précisés les caractères de la mutation génétique qui porte, soit sur les gènes de structure, soit sur les gènes de débit. En cas de mutation portant sur les gènes de débit, il y a diminu-

tion réelle de la quantité de l'enzyme dont les caractéristiques moléculaires et les constantes d'activité sont identiques à celles de l'enzyme normal. Les mutations des gènes de structure atteignent ou non les sites actifs de l'enzyme. Dans le premier cas, quelles que soient les propriétés physico-chimiques de la protéine, les constantes d'activité sont anormales; dans l'autre cas, ce sont les caractéristiques de la protéine qui diffèrent de celles de l'enzyme normal, mais l'activité fonctionnelle est conservée.

L'étude des érythroenzymopathies nous a permis d'explorer un certain nombre d'affections assez diverses, les unes rencontrées avec une grande fréquence, les autres rares et encore imprécisées. Au cours de ces trois dernières années, nous avons donc été amenés à étudier successivement un déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase chez un jeune sujet de race noire, un déficit passager affectant ce même enzyme chez un jeune enfant d'origine nord-africaine et un cas de favisme chez un enfant né de parents italiens. Nous avons donc pu démontrer par là le polymorphisme et la fréquence relative de cette tare qui est passée à présent dans le domaine de la biologie courante. Nous avons relevé en outre une anémie hémolytique accompagnée d'une très importante hyperactivité enzymatique, illustrant parfaitement la richesse enzymatique des jeunes cellules hématopoïétiques. Enfin, deux affections présentaient une extériorisation importante de l'ATPase érythrocytaire : la première étiquetée à l'origine comme déficit en 6-phosphogluconate-déshydrogénase, la seconde identifiée comme une anémie rachitique du type Von Jaksch Luzet, mais il nous a pas été possible de conclure quant à l'étiologie de ces deux troubles. S'agit-il d'une anomalie portant sur l'ATPase ou bien cette hyperactivité ATPasique est-elle la conséquence d'un trouble biochimique touchant la structure du stroma érythrocytaire ? La question reste posée.

Nous avons donc étudié les enzymes de la glycolyse ainsi que ceux propres à la paroi du globule rouge. Pour compléter ce tour d'horizon des anémies hémolytiques congénitales non sphérocytaires, nous avons pu mettre en évidence un déficit passager en diaphorase. Ce déficit touche contrairement aux précédents, les systèmes d'oxydo-réduction de l'hématie.

L'enzymopathologie du globule rouge représente aujourd'hui une entité bien définie de l'hématologie. De connaissance récente, elle n'est pas encore entrée dans le domaine de la médecine courante, cependant son importance va sans cesse grandissante, s'étendant progressivement à toutes les cellules sanguines, hématies, leucocytes et plaquettes, et elle est appelée à l'avenir à jouer un rôle déterminant dans l'explication et l'interprétation de bon nombre d'affections hématologiques.

# B I B L I O G R A P H I E

(1) - AXELROD (B.) - Dans Metabolic pathways, by Greenberg, Academic Press, New York, 1960, 1, 97-125.

(2) - BIRD (M.) - J. Biol. Chem., 1947, 169, 493.

(3) - RAPOPORT (S.), LUEBERING (J.) - The formation of 2,3-diphosphoglycerate in rabbit erythrocytes. The existence of a diphosphoglycerate mutase.

J. Biol. Chem., 1950, 183, 507.

(4) - HORECKER (B.L.), SMYRNIOTIS (P.Z.), SEEGMILLER (J.E.) - The enzymic conversion of 6-phosphogluconate to ribulose-5-P and ribose-5-P.

J. Biol. Chem., 1951, 193, 383.

(5) - BEUTLER (E.) - The glutathione instability of drug sensitive red cells. A new method for the in vitro detection of drug sensitivity.

J. Lab. Clin. Med., 1957, 49, 84.

(6) - SASS (P.W.), SASS(M.D.) - Some current concepts of red cell metabolism. I. Metabolic processes in the red cell.

Metabolism, 1964, 13, 10.

(7) - TAKAHARA (S.), HAMILTON (H.B.), NEEL (J.V.), KOBARA (T.Y.), OGURA (Y.), NISHIMURA (E.T.), OZAKI (K.), ITO (K.) - Hypocatalasemia : a new genetic carrier state.

J. Clin. Invest., 1960, 39, 610.

(8) - BONSIGNORE (A.), FORNAINI (G.), LEONCINI (G.), CALABRIA (G.A.), SEGNI (R.), CASTELLANI (A.) - Atti XII Riunione Naz. Soc. It. Biochemica, Siena n.243.

(9) - BARTLETT (G.R.), BUCOLO (G.) - The metabolism of ribonucleoside by the human erythrocyte.

Biochim. Biophys. Acta, 1968, 156, 240-253.

(10) - BARTLETT (G.R.) - The metabolism of deoxyribonucleoside by the human erythrocyte.

Biochim. Biophys. Acta, 1968, 156, 254-265.

(11) - LÖHR (G.W.), WALLER(H.D.), KARGES (O.), SCHLEGEL (B.), MULLER (A.A.) - Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrocyten.

Klin. Wschr., 1958, 36, 1008.

(12) - BARTHELMAI (W.) - Die Entwicklung der Enzymaktivitäten in Erythrocyten während des kindlichen Lebensalters.

Msch. Kinderheilk., 1968, 116, 6, 410-412.

(13) - WITT (I.), HERDAN (M.), KÜNZER (W.) - Vergleichende Untersuchungen von Enzymaktivitäten in Reticulocyten-reichen und Reticulocyten-armen Fraktionen aus Neugeborenen und Erwachsenenblut.

Klin. Wschr., 1968, 46, 149-151.

(14) - POWELL (D.R.), DE GOWIN (R.L.) - Relationship between activity of pyruvate kinase and age of the normal human erythrocyte.

Nature, 1965, 205, 507.

(15) - CHAPMAN (R.G.), SCHAUMBURG (L.) - Glycolysis and glycolytic enzyme activity of aging red cells in Man.

Brit. J. of Haematol., 1967, 13, 5.

(16) - KAPLAN (J.C.), TILDON (J.T.) - Pediatrics, 1963, 32, 371-375.

(17) - FORNAINI (G.) - Biochemical modifications during the life span of the erythrocyte.

Ital. J. Biochem., 1967, 16, 5.

(18) - COTTE (J.), KISSIN (C.), MATHIEU (M.), CUIVRE (M.), FREYCON (F.) - Notre expérience de deux ans d'enzymologie globulaire en pédiatrie. A propos de 250 cas.

Ann. Biol. Clin., 1967, 25, 10-12, 1129-1154.

(19) - BETKE (K.), MARTI (H.R.), SCHLICHT (I.) - Nature, 1959, 184, 1877.

(20) - EATON (G.M.), BREWER (G.J.), TASHIAN (R.T.) - Hexokinase isozyme patterns of human erythrocytes and leucocytes.

Nature, 1966, 212, 944.

(21) - HOLMES (E.W. Jr.), MALONE (J.I.), WINEGRAD (A.I.), OSKI (F.A.) - Hexokinase isoenzymes in human erythrocytes. Association of type II with fetal hemoglobin.

Science, 1967, 156, 646.

(22) - SCHRÖTER (W.), TILLMAN (W.) - Hexokinase isozymes in human erythrocytes of adults and newborns.

Biol. Biophys. Res. Com., 1968, 31, 1, 92.

(23) - VALENTINE (W.N.), OSKI (F.A.), PAGLIA (D.E.), BAUGHAN (M.A.), SCHNEIDER (A.S.), NAIMAN (J.L.) - Hereditary hemolytic anemia with hexokinase deficiency. Role of hexokinase in erythrocyte aging.

New Engl. J. Med., 1967, 276, 1-11.

(24) - SPENCER (N.), HOPKINSON (D.A.), HARRIS (H.) - Phosphoglucomutase polymorphism in man.

Nature, 1964, 204, 742-745.

(25) - HOPKINSON (D.A.), HARRIS (H.) - Evidence for a second "structural" locus determining human phosphoglucomutase.

Nature, 1965, 208, 410-412.

(26) - LIE INJO (L.E.) - Phosphoglucomutase polymorphism : an unusual type in Negroes.

Nature, 1966, 210, 1183-1184.

(27) - MOURANT (A.E.), TILLS (D.) - Phosphoglucomutase frequencies in Habbanite Jews and Icelanders.

Nature, 1967, 214, 810.

(28) - LIE INJO (L.E.), LOPEZ (C.G.), POEY OEY (H.G.) - Erythrocyte and leucocyte phosphoglucomutase in Chinese.

Am. J. Hum. Gen., 1968, 20, 2.

(29) - BAUGHAN (M.A.), VALENTINE (W.N.), PAGLIA (D.E.), WAYS (P.O.), SIMONS (E.R.), DE MARSH (G.B.) - Hereditary hemolytic anemia associated with glucose phosphate isomerase deficiency. A new enzyme defect of human erythrocytes.

Blood, 1968, 32, 2.

(30) - Dr. Phillip FOLLAND - University of Kentucky Medical School. (Observation non publiée à ce jour).

(31) - SCHNEIDER (A.S.), VALENTINE (W.N.), HATTORI (M.), HEINS (H.L. Jr.) - Hereditary hemolytic anemia with triose phosphate isomerase deficiency.

New Engl. J. Med., 1965, 272, 229-235.

(32) - SCHNEIDER (A.S.), DUNN (I.), IBSEN (K.H.), WEINSTEIN (M.) - Pattern of glycolysis in erythrocyte triose phosphate isomerase deficiency.
Clin. Res., 1965, 13, 382.

(33) - SCHRÖTER (W.), HEYDEN (H.V.) - Kinetik des 2,3-diphosphoglycerateumsatzes in menschlichen Erythrocyten.

Biochem. Zeitsch., 1965, 341, 387.

(34) - ROSE (Z.B.) - The purification and properties of diphosphoglycerate mutase from human erythrocytes.

J. Biol. Chem., 1968, 243, 18, 4810.

(35) - PRANKERD (T.A.J.), BOWDLER (A.J.) - Studies in congenital non spherocytic haemolytic anemia with specific enzyme deficit.
Acta Haemat., 1964, 31, 65.

(36) - LÖHR (G.N.), WALLER (H.D.) - Zur Biochemie einer angeborenen hämolytischer Anämie.
Folia Haemat., 1963, 8, 377.

(37) - ALAGILLE (D.), FLEURY (J.), ODIEVRE (M.) - Déficit congénital en 2,3-diphosphoglycéromutase.
Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris, 1964, 115, 483.

(38) - SCHRÖTER (W.) - Kongenitale nichtsphärocytäre hämolytische Anämie bei 2,3-diphosphoglycerate-mutase Mangel der Erythrocyten im frühen Säuglingsalter.
Klin. Wschr., 1965, 43, 1147.

(39) - TANAKA (K.R.), VALENTINE (W.N.), MIWA (S.) - Pyruvate kinase deficiency hereditary non spherocytic hemolytic anemia.
Blood, 1962, 19, 3, 267.

(40) - MALLARME (J.), BOIVIN (P.), GERBAUX (J.) - L'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire par déficit en pyruvate-kinase.
Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris, 1964, 115, 483.

(41) - OSKI (F.A.), DIAMOND (L.K.) - Erythrocyte pyruvate kinase deficiency resulting in congenital non spherocytic hemolytic anemia.
New Engl. J. Med., 1963, 269, 763.

(42) - CARTIER (P.), NAJMAN (A.), LEROUX (J.P.), TEMKINE (H.) - Les anomalies de la glycolyse au cours de l'anémie hémolytique par déficit du globule rouge en pyruvate-kinase.
Clin. Chim. Acta, 1968, 22, 165-181.

(43) - NATHAN (D.G.), OSKI (F.A.), SIDEL (V.W.), DIAMONS (L.K.) - Extreme hemolysis and red cell distortion in erythrocyte pyruvate kinase deficiency. II. Measurements of erythrocyte glucose consumption, potassium flux and adenosine triphosphate stability.
New Engl. J. Med., 1965, 272, 118-123.

(44) - BOIVIN (P.), GALAND (C.) - Les anémies enzymopéniques, un bilan.
Path. Biol., 1967, 15, 21-22, 1089-1095.

(45) - BIGLEY (R.H.), TENZEL (P.), JONES (R.T.), CAMPOS (J.O.), KOLER (R.D.) - Tissue distribution of human pyruvate kinase isozymes.
Enzym. Biol. Clin., 1968, 9, 10-20.

(46) - STEINMETZ (M.A.), DEAL (W.C.) - Metabolic control and structure of glycolytic enzymes. III. Dissociation and subunit structure of rabbit muscle pyruvate-kinase.
Biochemistry, 1966, 5, 1399-1405.

(47) - ZUELZER (W.W.), ROBINSON (A.R.), HSU (T.H.J.) - Erythrocyte pyruvate kinase deficiency in non spherocytic hemolytic anemia. A system of multiple genetic markers. Blood, 1968, 32, 1, 33.

(48) - SACHS (J.R.), WICKER (D.J.), GILCHER (R.O.), CONRAD (M.E.), COHEN (R.J.) - Familial hemolytic anemia resulting from an abnormal red blood cell pyruvate kinase.
J. Lab. Clin. Med., 1968, 72, 3, 359.

(49) - BOIVIN (P.), GALAND (C.) - Recherche d'une anomalie moléculaire lors des déficits en pyruvate-kinase érythrocytaire.
N. R. F. Hémat., 1968, 8, 2, 201-208.

(50) - PAGLIA (D.E.), VALENTINE (W.N.), BAUGHAN (M.A.), MILLER (D.R.), REED (C.F.), Mc INTYRE (O.R.) - An inherited molecular lesion of erythrocyte pyruvate kinase. Identification of a kinetically aberrant isozyme associated with premature hemolysis.
J. Clin. Invest., 1968, 47, 1929.

(51) - MARKERT (C.L.) - Lactate dehydrogenase isozymes : dissociation and recombination of subunits.
Science, 1963, 140, 1329.

(52) - CAHN (R.D.), KAPLAN (N.O.), LEVINE (L.), ZWILLING (L.F.) - Nature and development of lactic dehydrogenases.
Science, 1962, 136, 962.

(53) - SCHAPIRA (G.), ROSA (J.) - Les isozymes de la lactico-déshydrogénase du globule rouge.
N. R. F. Hémat., 1967, 7, 109.

(54) - STARKWEATHER (W.H.), COUSMEAN (L.), SCHOCH (H.K.), ZARAFONETIS (C.J.) - Alterations of erythrocyte lactate dehydrogenase in man.
Blood, 1965, 26, 63.

(55) - GOODFRIEND (Th.), SOKOL (D.), KAPLAN (N.O.) - Control of synthesis of lactic acid dehydrogenases.
J. Mol. Biol., 1966, 15, 18.

(56) - NANCE (W.E.), CLAFIN (A.), SMITHIES (O.) - Lactic dehydrogenase : genetic control in man.
Science, 1963, 142, 1075.

(57) - BOYER (S.H.), FANIER (D.C.), WATSON-WILLIAM (E.J.) - Lactate dehydrogenase variant from human blood : Evidence for molecular subunits.
Science, 1963, 141, 642.

(58) - KRAUS (A.P.), NEELY (C.L.) - Human erythrocyte lactate dehydrogenase : four genetically determined variants.
Science, 1964, 145, 595.

(59) - JACOB (H.S.), JANDL (J.H.) - J. Clin. Invest., 1967, 46, 1073.

(60) - ICEN (A.) - Scan. J. Lab. Clin. Invest., 1967, 96, 20 suppl.

(61) - MASSEY (V.), WILLIAMS (C.H. Jr.) - On the reaction mecanism of yeast glutathione reductase.
J. Biol. Chem., 1965, 240, 4470.

(62) - HILL (A.S.), HAUT (A.), CARTWRIGHT (G.E.), WINTROBE (M.M.) - The role of non hemoglobin protein and reduced gluthatione in the protection of hemoglobin from oxidation in vitro.
J. Clin. Invest., 1964, 43, 17.

(63) - MANN (P.J.G.) - Biochem. J., 1932, 26, 786.

(64) - CARSON (P.E.), BREWER (G.J.), ICKES (C.) - Decreased gluthatione reductase with susceptibility to hemolysis.
J. Lab. Clin. Med., 1961, 58, 804.

(65) - BRITTINGER (G.), LÖFFLER (G.), KÖNIG (E.) - Angeborene nichtsphärocytäre hämolytische Anämie bei familiärem Mangel an DPNH- und TPNH-abhängiger Glutathion Reduktase der Erythrocyten.
Klin. Wschr., 1965, 8, 427-429.

(66) - LÖHR (G.W.), WALLER (H.D.) - Eine neue enzymopenische hämolytische Anämie mit Glutathion Reduktase-Mangel.
Med. Klin., 1962, 57, 1521.

(67) - LÖHR (G.W.), WALLER (H.D.), ZYSNO (E.), GEROK (W.), VOSS (D.), STRAUSS (G.)- Glutathion Reduktase Mangel mit hämatologischen und neurologischen Störungen.
Klin. Wschr., 1965, 43, 413.

(68) - EIFLER (R.), WAGENKNECHT (C.) - $NADH_2$- und $NADPH_2$-spezifische GSSG-Reduktasen in roten Blutzellen.
Acta Biol. Med. German., 1964, 13, 674.

(69) - BLUME (K.G.), RÜDIGER (H.W.), LÖHR (G.W.) - Electrophoresis of glutathione reductase from human red blood cells.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 151, 686-688.

(70) - NECHELES (Th.F.), BOLES (Th.A.), ALLEN (D.M.) - Erythrocyte Glutatione peroxydase deficiency and hemolytic disease of the newborn infant.
Pediatrics, 1968, 72, 3, 319-324.

(71) - GROSS (R.T.), BRACCI (R.), RUDOLPH (N.), SCHROEDER (E.), KOCHEN (J.A.) - Hydrogen peroxyde toxicity and detoxification in the erythrocytes of newborn infants.
Blood, 1967, 29, 481.

(72) - BOIVIN (P.), GALAND (G.) - La synthèse du glutathion au cours de l'anémie hémolytique congénitale avec déficit en glutathion réduit. Déficit congénital en glutathion synthétase érythrocytaire ?
N. R. F. Hémat., 1965, 5, 707.

(73) - GIBSON (Q.H.) - The reduction of methemoglobin in red cells and studies on the cause of idiopathic methemoglobinemia.
Biochem. J., 1948, 42, 13.

(74) - SCOTT (E.M.), Mc GRAW (J.C.) - Purification and properties of diphosphopyridine nucleotide diaphorase of human erythrocytes.
J. Biol. Chem., 1962, 237, 249.

(75) - FRICK (P.G.), BACHMANN (F.), SCHMID (J.R.) - Eine Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie infolge Diaphorase Mangels.
Acta Haemat., 1965, 34, 215.

(76) - HARTLEYB (H.), FISCHER (D.), HEIDT (P.), LÖHR (G.W.), LAUSECKER (Ch.) - Un nouveau cas de méthémoglobinémie congénitale récessive liée à un déficit en diaphorase I.
Arch. Franc. de Pédiatrie, 1964, 21, 10, 1197.

(77) - LAMY (M.), FREZAL (J.), JAMMET (M.L.), JOSSO (N.) - La méthémoglobinémie congénitale récessive.
N. R. F. Hémat., 1963, 3, 105.

(78) - SCOTT (E.M.) - The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia.
J. Clin. Invest., 1960, 39, 1176.

(79) - SCOTT (E.M.), HOSKINS (B.D.) - Hereditary methemoglobinemia in Alaskan Eskimos and Indians.
Blood, 1958, 13, 795.

(80) - BALSANO (P.), HARDY (W.R.), SCOTT (E.M.) - Hereditary methemoglobinemia due to diaphorase deficiency in Navajo Indians.
Pediatrics, 1964, 65, 6, 928.

(81) - BETKE (K.), STEIM (H.), TÖNZ (O.) - Untersuchung einer Familie mit kongenitaler Methämoglobinämie.
Dtsch. Med. Wschr., 1962, 87, 65.

(82) - JAFFE (E.R.), HELLER (P.) - Methemoglobinemia in Man.
Progr. in Hematol., 1964, 4, 48.

(83) - JAFFE (E.R.), NEUMANN (G.) - DPNH-Methemoglobin reductase activity and the reduction of methemoglobin in human erythrocytes.
Fed. Proc., 1964, 23, 470.

(84) - FIALKOW (P.J.), BROWDER (J.A.), SPARKES (R.S.), MOTULSKY (A.) - Mental retardation in methemoglobinemia due to diaphorase deficiency.
New Engl. J. Med., 1965, 273, 840.

(84 bis) - KAPLAN (J.C.) - Les systèmes d'oxydo-réduction du globule rouge et leurs anomalies.
N. R. F. Hémat., 1966, 6, 809.

(85) - DERN (R.J.), BEUTLER (E.), ALVING (A.S.) - The hemolytic effect of primaquine. The natural course of the hemolytic anemia and the mecanism of its self limited character.
J. Lab. Clin. Med., 1954, 44, 171.

(86) - CARSON (P.E.), FLANAGAN (C.L.), ICKES (C.E.), ALVING (A.S.) - Enzymatic deficiency in primaquine sensitive erythrocytes.
Science, 1956, 124, 484.

(87) - WALLER (H.D.), LÖHR (G.W.), TABATABAI (M.) - Hämolyse und Fehlen von Glucose-6-phosphate dehydrogenase in roten Blutzellen. (Eine Fermentanomalie der Erythrocyten).
Klin. Wschr., 1957, 35, 1022.

(88) - KELLERMEYER (R.W.), TARLOV (A.R.), SCHRIER (S.L.), CARSON (P.E.), ALVING (A.S.) - The hemolytic effect of primaquine. XIII Gradient susceptibility to hemolysis of primaquine sensitive erythrocytes.
J. Lab. Clin. Med., 1961, 58, 225.

(89) - MARKS (P.A.), GROSS (R.T.) - Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : evidence of difference between Negroes and Caucasians with respect to this genetically determined trait.
J. Clin. Invest., 1959, 38, 2253.

(90) - MARKS (P.A.) - Aspects biochimiques du vieillissement du globule rouge et de l'anémie hémolytique d'origine médicamenteuse.
N. R. F. Hémat., 1961, 1, 900.

(91) - BERNARD (J.), NAJEAN (Y.), SCIALOM (C.), TANZER (J.) - Les manifestations aiguës du déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase.
Soc. Méd. Hôp. Paris, 1964, 115, 439.

(92) - BERNARD (J.), TANZER (J.), NAJEAN (Y.), MOULINIER (J.), SCIALOM (C.), LEVY (J.P.), PETROVER (M.) - La forme chronique de l'anémie hémolytique héréditaire par insuffisance en glucose-6-phosphate-déshydrogénase. Observations préliminaires sur une famille française.
N. R. F. Hémat., 1963, 3, 465.

(93) - ROTH (K.L.), FRUMIN (A.L.) - Studies on the hemolytic principe of the fava bean.
J. Lab. Clin. Invest., 1960, 56, 695.

(94) - SANSONE (G.), SEGNI (G.) - Nuovi aspetti dell'alterato biochimisco degli eritrociti di favici : assenza pressoche completa della glucoso-6-P deidrogenasi.
Bull. Soc. Ital. Biol. Sperim., 1958, 15, 327.

(95) - BERNARD (J.), DREYFUS (J.Cl.) - Hémolyse aiguë familiale et déficit de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase des érythrocytes.
N. R. F. Hémat., 1962, 2, 135.

(96) - BOUSSER (J.), BOIVIN (P.) - L'anémie hémolytique chronique avec déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase.
Soc. Méd. Hôp. Paris, 1964, 115, 467.

(97) - BOUSSER (J.), CHRISTOL (D.), BOIVIN (P.), MALLASENET (R.), LODS (J.C.) - Ictère hémolytique congénital non sphérocytaire avec déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase. Deux observations.
N. R. F. Hémat., 1963, 3, 505.

(98) - BOWLER (A.J.), PRANKERD (T.A.J.) - Studies on congenital non spherocytic hemolytic anemias with specific enzyme defects.
Acta Haemat., 1964, 31, 65.

(99) - CANFIELD (C.J.), HERMAN (Y.F.), HERMAN (R.H.), CONRAD (M.E.) - Refractory hemolytic disease associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hemosiderosis : report of a case.
J. Lab. Clin. Med., 1965, 66, 96.

(100) - CIRESA (M.), HUBER (H.), DITTRICH (P.V.) - Glucose-6-phosphate dehydrogenase und Lebendauer der Erythrocyten bei verschiedenen Anämieformen.
Klin. Wschr., 1964, 42, 647.

(101) - GARTLER (S.M.), GANDINI (E.), CEPPELLINI (R.) - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient mutant in human cell culture.
Nature, 1962, 199, 602.

(102) - HENNEMAN (H.H.), ESSERS (U.), STECHER (G.) - Chronischer nicht-sphärocytärer hämolytischer Ikterus bei völlingen Fehler der glucose-6-phosphate dehydrogenase Aktivität der Erythrocyten.
Klin. Wschr., 1964, 42, 1250.

(103) - LÖHR (G.W.), WALLER (H.D.) - Hämolytische Erythrocytopathie durch Fehler von Glukose-6-phosphat Dehydrogenase in roten Blutzellen als dominant vererbliche Krankheit.
Klin. Wschr., 1958, 36, 865.

(104) - LÖHR (G.W.), WALLER (H.D.) - Biochemie und Pathogenese der enzymopatischen Anämien.
Dtsch. Med. Wschr., 1961, 86, 27 et 87.

(105) - MOHLER (D.N.), CROCKETT (C.L.) - Hereditary hemolytic disease secondary to glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : Report of three cases with special emphasis on ATP metabolism.
Blood, 1964, 23, 427.

(106) - SAHIDI (N.T.), DIAMOND (L.K.) - Enzyme deficiency in erythrocytes in congenital non spherocytic hemolytic anemia.
Pediatrics, 1959, 24, 245.

(107) - WALLER (H.D.), LÖHR (G.W.), TABATABAI (M.) - Hämolyse und Fehlen von Glucose-6-phosphate dehydrogenase in roten Blutzellen (Eine Fermentanomalie der Erythrocyten).
Klin. Wschr., 1957, 35, 1022.

(108) - ZINKHAM (W.H.) - Metabolism of glucose by erythrocytes from patients with congenital hemolytic disorders.
J. Pediat., 1962, 60, 614.

(109) - ZINKHAM (W.H.), LENHARD (R.E.) - Metabolic abnormalities of erythrocytes from patients with congenital non spherocytic anemia.
J. Pediat., 1959, 55, 319.

(110) - DOXIADIS (S.A.), VALAES (T.), KARAKLIS (A.), STAVRAKAKIS (D.) - Risk of severe jaundice in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in newborn.
Lancet, 1964, 2, 1210.

(111) - DOXIADIS (S.A.), FESSAS (D.), VALAES (T.), MASTROKALOS (N.) - Glucose-6-phodphate dehydrogenase deficiency. A new aetiological factor of severe neo-natal jaundice.
Lancet, 1961, 1, 297.

(112) - FESSAS (P.), DOXIADIS (S.A.), VALAES (T.) - Neonatal jaundice in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient infants.
Brit. Med. J., 1962, 2, 1359.

(113) - GABBURRO (D.), VOLPATO (S.), GIAQUINTO (M.) - Ictère nucléaire du nouveau-né par défaut de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase.
Ann. Péd., 1961, 37, 373.

(114) - GABBURRO (D.), VOLPATO (S.), SCARPA (P.) - Pathologie érythrocytaire néonatale par défaut en glucose-6-phosphate-déshydrogénase.
Ann. Péd., 1962, 38, 625.

(115) - DOXIADIS (S.A.), FESSAS (P.), VALAES (T.) - Erythrocyte enzyme deficiency in unexplained kernicterus.
Lancet, 1960, 1, 44.

(116) - LAI (H.C.), LAI (M.P.Y.), LEUNG (K.S.N.) - Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in Chinese.
J. Clin. Pathol., 1968, 21, 44.

(117) - BLACKWELL (R.Q.), RO (I.H.), YEN (L.) - Low incidence of erythrocyte G6PD deficiency in Koreans.
Vox Sanguinis, 1968, 14, 299-303.

(118) - MESSERSCHMITT (J.), SUAUDEAU (C.), BENALLEGUE (A.), VENEZIA (R.), FABRE (S.), BON (J.), ANDRE (L.), KHATI (B.), DUBOIS (M.), BENABDALLAH (S.), KOTCHOYAN (P.) - Défaut en G6PD au cours des anémies hémolytiques en Algérie.
N. R. F. Hémat., 1967, 7, 827.

(119) - FRASER (G.R.), STAMATOYANNOPOULOS (G.), KATTAMIS (C.), LOUKOPOULOS (D.), DEFARANAS (B.), KITSOS (C.), ZANNOS-MARIOLEA (L.), CHOREMIS (C.), FESSAS (P.), MOTULSKY (A.G.) - Thalassemias, abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Arta area of Greece : diagnostic and genetic aspects of complete village studies.
Annals of the New York Academy of Sciences, 1964, 119, 2, 415-435.

(120) - CHILDS (B.), ZINKHAM (W.), BROWNE (E.A.), KIMBRO (E.L.), TORBERT (J.V.) - A genetic study of a defect in glutathione metabolism of the erythrocytes.
Bull. Johns Hop. Hosp., 1958, 102, 21.

(121) - BEUTLER (E.), YEH (M.), FAIRBANKS (V.F.) - The normal human female as a mosaïc of X chromosome activity : studies using the gene for G6PD deficiency at a marker.
Proc. Nat. acad. sci., 1962, 48, 1.

(122) - LYON (M.P.) - Gene action in the X chromosome of mouse (mus musculum L.).
Nature, 1961, 190, 372.

(123) - BEUTLER (E.), BALUDA (M.C.), KELLY (B.M.) - The role of methemoglobin in the mecanism of drug induced hemolytic anemia.
In Proc. IX th Cong. Intern. Soc. Hemat. Mexico City, 1962, 233.

(124) - KIRKMAN (H.N.) - Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. I. Further purification and characterization.
J. Biol. Chem., 1962, 237, 2364.

(125) - CHUNG (A.E.), LANGDON (R.G.) - Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. I. Isolation and properties of the enzyme. II. Enzyme coenzyme interrelationship.
J. Biol. Chem., 1963, 238, 2309 et 2317.

(126) - RATTAZZI (M.C.) - Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes: molecular weight determination by gel filtration.
Biochem. Biophys. Res. Com., 1968, 31, 1, 16.

(127) - BONSIGNORE (A.), DE FLORA (A.), MANGIAROTTI (M.A.), LORENZONI (I.), DINA (D.), CANCEDDA (R.) - Metabolism of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. I. Metabolite induced inactivation.
Ital. J. Biochem., 1968, 17, 1, 1.

(128) - BONSIGNORE (A.), DE FLORA (A.), MANGIAROTTI (M.A.), LORENZONI (I.), CANCEDDA (R.), DINA (D.) - Metabolism of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. II. Changes of quaternary structure of the enzyme during the metabolite induced inactivation and reactivation.
Ital. J. Biochem., 1968, 17, 2, 90.

(129) - RIMON (A.), ASHEKENASI (J.), RAMOT (B.), SHEBA (C.) - Activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase of enzyme deficient subjects. I. Activation by stroma of normal erythrocytes.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1960, 2, 138.

(130) - RAMOT (B.), ASHEKENAZI (J.), RIMON (A.), ADAM (A.), SHEBA (C.) - Activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase of enzyme deficient subjects. II. Properties of the activator and activation reaction.
J. Clin. Invest., 1961, 40, 611.

(131) - BOYER (S.H.), PORTER (I.H.) - Electrophoretic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and its relationship to enzyme deficiency (Abst.).
J. Clin. Invest., 1962, 41, 1347.

(132) - KIRKMAN (H.N.), HENDRICKSON (E.M.) - Sex-linked electrophoretic difference in glucose-6-phosphate dehydrogenase.
Amer. J. Human Genet., 1963, 15, 241.

(133) - BONSIGNORE (A.), FORNAINI (G.), FANTONI (A.), LEONCINI (G.) - Purification and properties of the glucose-6-phosphate dehydrogenase from the human erythrocytes and leucocytes.
Ital. J. Biochem., 1965, 14, 217.

(134) - BEUTLER (E.), COLLINS (Z.) - Hybridization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat and human erythrocytes.
Science, 1965, 150, 1306.

(135) - LUZZATTO (L.), ALLAN (N.C.), DE FLORA (A.) - Genetic polymorphism of glucose-6-phosphate dehydrogenase.
Biochem. J., 1965, 97, 19.

(136) - JACOB (H.S.), JANDL (J.H.) - Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. I. Mechanism of hemolysis.
J. Clin. Invest., 1961, 41, 779.

(137) - JACOB (H.S.), JANDL (J.H.) - Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. II. Studies in vivo.
J. Clin. Invest., 1961, 41, 1514.

(138) - SZEINBERG (A.), CLEJAN (L.) - Sulfhydryl group in the red cells of normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient subjects.
Israel J. Med. Sci. 1965, 1, 840.

(139) - COHEN (G.), HOCHSTEIN (P.) - Glucose-6-phosphate dehydrogenase and detoxification of hydrogen peroxyde in human erythrocytes.
Science, 1961, 134, 1756.

(140) - DESFORGES (J.F.) - Effects of acetylphenylhydrazine on phosphate uptake and incorporation in erythrocytes.
Blood, 1964, 23, 445.

(141) - DESFORGES (J.F.), SIMANAVICIUS (D.) - Some effects of acetylphenylhydrazine on red cell metabolism (Abst.).
Blood, 1962, 20, 786.

(142) - MOHLER (D.N.), WILLIAMS (W.J.) - The effect of phenylhydrazine on the adenosine triphosphate content of normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient human blood.
J. Clin. Invest., 1961, 40, 1735.

(143) - SHAFER (W.) - The carbohydrate intermediates of erythrocytes deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase.
Blood, 1965, 26, 82.

(144) - WEED (R.), EBER (J.), ROHSTEIN (A.) - Effects of primaquine and related compounds on the red blood cell membrane. I. $Na^+$ and $K^+$ permeability in normal human cells.
J. Clin. Invest., 1961, 40, 130.

(145) - WEED (R.), EBER (J.), ROHSTEIN (A.) - Effects of primaquine on the red cell membrane. II. $K^+$ permeability in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes.
J. Clin. Invest., 1961, 40, 140.

(146) - TARLOV (A.R.), BREWER (G.J.), CARSON (P.E.), ALVING (A.A.) - Primaquine sensitivity.
Arch. Int. Med., 1962, 109, 209.

(147) - SZEINBERG (A.), ZAIDMAN (J.), CLEJAN (L.) - Investigation of the lipid content of normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells.
Israel J. Med. Sci., 1965, 1, 833.

(148) - PORTER (I.H.), BOYER (S.H.), WATSON-WILLIAMS (E.J.), ADAM (A.), SZEINBERG (A.), SINISCALCO (M.) - Variation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in different populations.
Lancet, 1964, 1, 895.

(149) - LONG (W.K.), KIRKMAN (H.N.), SUTTON (H.E.) - Electrophoretically slow variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase from red cells of Negroes.
J. Lab. Clin. Med., 1965, 65, 81.

(150) - BOYER (S.H.), PORTER (I.H.), WEILBACHER (R.G.) - Electrophoretic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and its relation to enzyme deficiency in Man.
Proc. Nat. Acad. Sci., 1962, 48, 1868.

(151) - KIRKMAN (H.N.), SIMON (E.R.), PICKARD (B.M.) - Seattle variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase.
J. Lab. Clin. Med., 1965, 66, 5, 834.

(152) - RAMOT (B.), BAUMINGER (S.), BROK (F.), GAFNI (D.), SCHWARTZ (J.) - Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase in Jewish mutants.
J. Lab. Clin. Med., 1964, 64, 895.

(153) - RAMOT (B.), BAUMINGER (S.), BROK (F.), SCHWARTZ (J.) - Heterogeneity among glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient mutants.
Israel J. Med. Sci., 1965, 1, 764.

(154) - SHOWS (T.B.), TASHIAN (R.E.), BREWER (G.J.), DERN (R.J.) - Erythrocytes glucose-6-phosphate dehydrogenase in Caucasians. New inherited variant.
Science, 1964, 145, 1056.

(155) - MARKS (P.A.), BANKS (J.), GROSS (R.T.) - Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.
Nature, 1962, 194, 454.

(156) - Mc CURDY (P.R.), KIRKMAN (H.N.), NAIMAN (J.L.), JIM (R.T.S.), PICKARD (B.M.)- A chinese variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase.
J. Lab. Clin. Med., 1966, 67, 374.

(157) - WONG (P.W.K.), LING YU SHI (D.), YI YUNG HSIA, TSAO (Y.C.) - Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase among Chinese.
Nature, 1965, 208, 1323.

(158) - NANCE (W.E.), UCHIDA (I.) - Turner's syndrome and an unusual variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase.
Amer. J. Human Genet., 1964, 16, 380.

(159) - BOIVIN (P.), GALAND (C.) - Nouvelles variantes de la glucose-6-phosphate déshydrogénase érythrocytaire.
Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol., 1968, 13, 30-39.

(160) - AZEVEDO (E.), KIRKMAN (H.N.), MORROW (A.C.), MOTULSKY (A.G.) - Variants of red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase among Asiatic Indians.
Ann. Hum. Genet., Lond., 1968, 31, 373.

(161) - KIRKMAN (H.W.), CROWELL (B.B.) - Molecular deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase in primaquine sensitivity.
Nature, 1963, 197, 286.

(162) - KIRKMAN (H.N.), SCHETTINI (F.), PICKARD (B.M.) - Mediterranean variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase.
J. Lab. Clin. Med., 1964, 63, 726.

(163) - VECCHIO (F.), SCHETTINI (F.), DI FRANCESCO (L.), MELONI (T.), RUSSINO (G.)- Electrophoretic studies of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase in normal and enzyme deficient sardinian subjects.
Acta Haemat., 1966, 35, 46.

(164) - KIRKMAN (H.N.), RILLEY (H.D.) - A new expression of G6PD in a family with congenital non spherocytic hemolytic anemia.
Amer. J. Des. Child., 1961, 102, 584.

(165) - KIRKMAN (H.N.), ROSENTHAL (I.M.), SIMON (E.R.), CARSON (P.E.),BRINSON(A.G.)- "Chicago I" variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase in congenital hemolytic disease.
J. Lab. Clin. Med., 1964, 63, 715.

(166) - WESTRING (D.W.), PISCIOTTA (A.V.) - Anemia, cataracts and seizures in patient with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.
Arch. Int. Med., 1966, 118, 385.

(167) - HELGE (H.), BORNER (K.) - Kongenitale nichtsphärocytäre hämolytische Anämie, Katarakt und glucose-6-phosphate dehydrogenase Mangel.
Dtsch. Med. Wschr., 1966, 91, 1584.

(168) - CARSON (P.E.), FRISCHER (H.) - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related disorders on the pentose phosphate pathways.
Amer. J. Med., 1966, 41, 744.

(169) - BEUTLER (E.), MATHAI (C.K.), SMITH (J.E.) - Biochemical variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase giving rise to congenital non spherocytic hemolytic disease.
Blood, 1968, 31, 2, 131.

(170) - BREWER (G.J.), DERN (R.J.) - A new inherited enzymic deficiency of human erythrocytes 6-phosphogluconate dehydrogenase deficiency.
Amer. J. Hum. Gen., 1964, 16, 4, 472.

(171) - PARR (C.W.), FITCH (L.I.) - Hereditary partial deficiency of human erythrocyte phosphogluconate dehydrogenase.
Biochem. J., 1964, 93, 280.

(172) - LAUSECKER (C.H.), HEIDT (P.), FISCHER (D.), HARTLEYB (H.), LÖHR (G.W.) - Anémie hémolytique constitutionnelle avec déficit en 6-phosphogluconate-déshydrogénase. Un nouveau type d'anémie avec carence enzymatique intra-érythrocytaire.
Arch. Franç. Pédiat., 1965, 22, 789.

(173) - SCIALOM (C.), NAJEAN (Y.), BERNARD (J.) - Anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire avec déficit incomplet en 6-phosphogluconate-déshydrogénase.
N. R. F. Hémat., 1966, 6, 452.

(174) - AJMAR (F.), SCHARRER (B.), HASHIMOTO (F.), CARSON (P.E.) - Interrelation of stromal NAD(P)ase and human erythrocytic 6-phosphogluconic dehydrogenase.
Proc. Nat. Acad. Sci., 1968, 59, 2, 538.

(175) - FILDES (R.A.), PARR (C.W.) - Human red cell phosphogluconate dehydrogenase.
Nature, 1963, 200, 890.

(176) - CARTER (N.D.), FILDES (R.A.), FITCH (L.I.), PARR (C.W.) - Genetically determined electrophoretic variations of human phosphogluconate dehydrogenase.
Acta Genet., 1968, 18, 109.

(177) - HARVALD (B.), HANEL (K.H.), SQUIRES (R.), TRAP-JENSEN (J.) - Adenosine triphosphatase deficiency in patients with non spherocytic hemolytic anemia.
Lancet, 1964, 2, 18.

(178) - COTTE (J.), KISSIN (C.), MATHIEU (M.), PONCET (J.), MONNET (P.), SALLE (B.), GERMAIN (D.) - Observation d'un cas de déficit partiel en ATPase intra-érythrocytaire.
Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol., 1968, 13, 284.

(179) - MIRCEVOVA (L.), BRABEC (V.), PALEK (J.) - Adenosin triphosphatase Activity in hereditary spherocytosis.
Blut, 1967, 15, 149.

(180) - SKOU (J.C.) - The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves.
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 23, 394.

(181) - POST (R.L.), MERRITT (C.L.), KINSOLVING (C.R.), ALBRIGHT (C.D.) - Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte.
J. Biol. Chem., 1960, 235, 1796.

(182) - BREWER (G.J.), EATON (J.W.), BECK (C.C.), FEITLER (L.), SHREFFLER (D.C.) - Sodium-potassium stimulated ATPase activity of mammalian hemolysates : clinical observations and dominance of ATPase deficiency in the potassium polymorphism of sheep.
J. Lab. Clin. Med., 1968, 71, 744.

(183) - SEN (A.K.), POST (R.L.) - Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte.
J. Biol. Chem., 1964, 239, 345.

(184) - GARDOS (G.), SZASZ (I.) - The mecanism of ion transport in human erythrocytes. II. The role of histamine in the regulation of cation transport.
Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung., 1968, 3, 13.

(185) - MARCHESI (V.T.), PALADE (G.E.) - The localization of Mg-Na-K-activated adenosine triphosphatase on red cell ghost membranes.
J. Cell. Biol., 1967, 35, 2, 385.

(186) - WACHSTEIN (M.), MEISEL (E.) - Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH.
Am. J. Clin. Pathol., 1957, 27, 13.

(187) - MASIAK (S.J.), GREEN (J.W.) - Relationship of $Na^+$, $K^+$ and $Mg^{++}$-ATP binding sites for the human erythrocyte stromal ($Na^+ + K^+$)-dependent ATPase.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 159, 340.

(188) - WHITTAM (R.), AGER (M.E.) - The connexion between active cation transport and metabolism in erythrocytes.
Biochem. J., 1965, 97, 214.

(189) - WALZ (F.G. Jr.), CHAN (P.C.) - Effects of cysteine and potassium on the ATP-dependent retention of sodium ions by erythrocyte membranes.
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 135, 885.

(190) - MATSUI (H.), SCHWARTZ (A.) - Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the ($Na^+$-$K^+$)-dependent ATPase from cardiac tissue.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 151, 655.

(191) - MIRCEVOVA (L.), SIMONOVA (A.) - The influence of sugar substances on the adenosin-triphosphatase activity of the erythrocyte membrane.
Arch. Intern. Physiol. Bioch., 1967, 75, 593.

(192) - PONDER (E.) - The cell membrane and its properties.
Dans the Cell, Biochemistry, Physiology, Morphology, edit. by J. Brachet and A.E. Mirsky, Academic Press, New York, 1961, 2, 1.

(193) - PALEK (J.), MIRCEVOVA (L.), BRABEC (V.), FRIEDMANN (B.), MAJSKY (A.) - non publié.

(194) - SKOU (J.C.) - Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of $Na^+$ and $K^+$.
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 58, 314.

(195) - MIRCEVOVA (L.), SIMONOVA (A.), MICHALEC (C.), KOLMAN (Z.) - The influence of hemolysins on the ATPase activity and the composition of erythrocyte membrane.
Enzym. Biol. Clin., 1968, 9, 31.

(196) - BANGHAM (A.D.), HORNE (R.V.), GLAUERT (A.M.), DINGLE (J.T.), LUEY (J.A.) - Action of saponin on biological cell membranes.
Nature, 1962, 196, 952.

(197) - KLIBANSKY (Ch.), DE VRIES (A.) - Quantitative study of erythrocyte-lysolecithin interaction.
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 70, 176.

(198) - OHNISHI (T.) - Extraction of actin- and myosin-like proteins from erythrocyte membrane.
J. Biochem., 1962, 52, 307.

(199) - NG WON (G.), DONNELL (G.N.), BERGREEN (W.R.) - Deficiency of erythrocyte nicotinamide adenine dinucleotide nucleosidase (NADase) activity in Negro. Nature, 1968, 217, 64.

(200) - ALIVISATOS (S.G.A.), KASHKET (S.), DENSTEDT (O.F.) - The metabolism of the erythrocyte. IX. Diphosphopyridine nucleotidase of erythrocytes.
Canad. J. Biochem. Physiol., 1956, 34, 46.

(201) - JAFFE (E.) - The reduction of methemoglobin in erythrocytes of a patient with congenital methemoglobinemia, subjects with erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and normal individuals.
Blood, 1963, 21, 561.

(202) - BONSIGNORE (A.), FORNAINI (G.), SEGNI (G.), FANTONI (A.) - Glutathione reductase and methemoglobin reductase in erythrocytes of human subjects with a case history of favism.
Ital. J. Biochem., 1960, 9, 345.

(203) - FAIRBANKS (V.F.), BEUTLER (E.) - A simple method for detection of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD spot test).
Blood, 1962, 20, 591.

(204) - MOTULSKY (A.G.), CAMPBELL-KRAUT (J.M.) - Population genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency of the red cell.
Dans Proceedings of the Conference on Genetic Polymorphisms and Geographic Variations in Diseases, edit. by B.S. Blumberg, Grune and Stratton, New York, 1961, 1, 159.

(205) - OSKI (F.A.), GROWNEY (P.M.) - A simple micromethod for the detection of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase.
J. Ped., 1965, 6, 90.

(206) - BREWER (G.J.), TARLOV (A.R.), ALVING (A.S.) - Methemoglobin reduction test.
Bull. World Hlth. Org., 1960, 22, 633.

(207) - JACOB (H.S.), JANDL (J.H.) - A simple visual screening test for the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency employing ascorbate and cyanide.
New Engl. J. Med., 1966, 274, 1162.

(208) - FAIRBANKS (V.F.), LAMPE (L.T.) - A tetrazolium-linked cytochemical method for estimation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in individual erythrocytes : applications in the study of heterozygotes for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.
Blood, 1968, 31, 589.

(209) - MILLER (D.R.), KOTOK (D.) - The micromethemoglobin reduction screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in childhood.
Pediatrics, 1968, 41, 528.

(210) - KNUTSEN (C.A.), BREWER (G.J.) - A micromethemoglobin reduction test for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.
Amer. J. Clin. Path., 1966, 45, 82.

(211) - BERNSTEIN (R.) - A rapid screening dye test tor the detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in red cells.
Nature, 1962, 194, 192.

(212) - ELLS (H.A.), KIRKMAN (H.N.) - A colorimetric method for assay of erythrocytic glucose-6-phosphate dehydrogenase.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1961, 106, 607.

(213) - ZINKHAM (W.H.), LENHARD (R. E. Jr.) - Metabolic abnormalities of erythrocytes from patients with congenital non spherocytic hemolytic anemia.
J. Pediat., 1959, 55, 319.

(214) - Mc DOUGALL (L.G.) - Red cell metabolism in iron deficiency anemia.
Pediatrics, 1968, 72, 303.

(215) - POWELL (R.D.), DE GOWIN (R.L.) - Relationship between activity of pyruvate kinase and age of the normal human erythrocyte.
Nature, 1965, 205, 507.

(216) - VOLPATO (S.), VIGI (V.), CATTAROZZI (G.) - Non spherocytic haemolytic anaemia and severe jaundice in a newborn with partial pyruvate kinase deficiency.
Acta Paediat. Scand., 1968, 57, 59.

(217) - LARRIEU (M.J.), CAEN (J.), LELONG (J.C.), BERNARD (J.) - Maladie de Glanzmann. Etude clinique, biologique et pathogénique. A propos de cinq observations.
N. R. F. Hémat., 1961, 1, 662.

(218) - DREYFUS (J.C.) - Les anémies hémolytiques par anomalies intra-érythrocytaires. Ann. Biol. Clin., 1967, 25, 5-6, 555.

(219) - EVELYN (K.A.), MALLOY (H.T.) - Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood.
J. Biol. Chem., 1938, 126, 655.

(220) - CARTIER (P.), LEROUX (J.P.), TEMKINE (H.) - Techniques de dosage des intermédiaires de la glycolyse dans les tissus.
Ann. Biol. Clin., 1967, 25, 7-9, 791.

(221) - SHOJANIA (A.M.), ISRAELS (L.G.), ZIPURSKY (A.) - The relationship of adenosine triphosphate concentration to erythrocyte aging.
J. Lab. Clin. Med., 1968, 71, 41.

(222) - MILLS (G.C.), LEVIN (W.C.), ALPERIN (J.B.) - Hemolytic anemia associated with low erythrocyte ATP.
Blood, 1968, 32, 15.

(223) - HOOK (E.B.), STAMATOYANNOPOULOS (G.), YOSHIDA (A.), MOTULSKY (A.G.) - Glucose-6-phosphate dehydrogenase Madrona : a slow electrophoretic glucose-6-phosphate dehydrogenase variant with kinetic characteristics similar to those of normal type.
J. Lab. Clin. Med., 1968, 72, 404.

(224) - GRIMES (A.J.), MEISLER (A.), DACIE (J.V.) - Congenital Heinz-body anemia.
Brit. J. Haemat., 1964, 10, 281.

(225) - JACOB (H.S.), BRAIN (M.C.), DACIE (J.V.) - Blockade of membrane and globin thiols in the pathogenesis of congenital Heinz body hemolytic anemia with dipyrroluria (Abst.).
J. Clin. Invest., 1967, 46, 1073.

(226) - ORSINI (A.), COIGNET (J.), BERNARD (P.J.), ODDO (G.) - Exploration par le radiochrome 51 et le radiofer 59 dans le syndrome de Von Jaksch Luzet.
Arch. Franç. Péd., 1967, 24, 195.

(227) - KISSIN (C.), COTTE (J.), MATHIEU (M.), FREYCON (F.) - Contribution à l'étude du mécanisme de l'hémolyse dans le syndrome de Von Jaksch Luzet. Exploration des enzymes de la glycolyse intra-érythrocytaire. Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol., 1968, 13, 186.

(228) - WROBLEWSKI (F.), LA DUE (J.S.) - Determination of lactico-dehydrogenase. Proc. Soc. Exp. Biol., New York, 1955, 90, 210.

(229) - CAZAL (P.) - Erythrocytes et érythropathies. Masson et Cie Edit., Paris, 1957, 1, 60.

Vu, Strasbourg, le 14 Avril 1969.

Le Président du Jury,

P. MÉTAIS.

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 15 Avril 1969.

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

M. HASSELMANN.

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 15 Avril 1969.

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

M. HASSELMANN.

TABLE DES MATIERES

Page

INTRODUCTION ..... 1

PREMIERE PARTIE

LE METABOLISME DU GLOBULE ROUGE.

Chapitre I - Métabolisme du globule rouge ..... 5

Chapitre II - Evolution biochimique du globule rouge ..... 15

Chapitre III - Hexokinase ..... 19

Chapitre IV - Phosphoglucomutase ..... 22

Chapitre V - Glucose-phosphate-isomérase ..... 25

Chapitre VI - Triose-phosphate-isomérase ..... 27

Chapitre VII - 2,3-diphosphoglycéromutase ..... 29

Chapitre VIII Pyruvate-kinase ..... 31

Chapitre IX - Lactico-déshydrogénase ..... 36

Chapitre X - Anomalies portant sur le glutathion ..... 40

Chapitre XI - Les méthémoglobines-réductases ..... 47

Chapitre XII - Glucose-6-phosphate-déshydrogénase ..... 52

Chapitre XIII 6-phosphogluconate-déshydrogénase ..... 66

Chapitre XIV - Adénosine-triphosphatase ..... 72

Chapitre XV - Nicotinamide-adénine-nucléotide-nucléosidase ..... 81

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES :

A - TECHNIQUES DE DOSAGE DES ENZYMES DU GLOBULE ROUGE.

Introduction ..... 85

Chapitre I - Détermination de l'activité de la G6PD érythrocytaire 88

Page

Chapitre II - Détermination de l'activité de la 6PGD érythrocytaire 96

Chapitre III - Détermination de l'activité de la pyruvate-kinase érythrocytaire ..... 100

Chapitre IV - Détermination de l'activité de la lactico-déshydrogénase érythrocytaire ..... 104

Chapitre V - Détermination de l'activité des glutathions-réductases érythrocytaires ..... 107

Chapitre VI - Détermination de l'activité de la diaphorase érythrocytaire ..... 111

Chapitre VII - Détermination de l'activité de l'ATPase érythrocytaire ..... 115

Chapitre VIII - Détermination de l'ATP érythrocytaire ..... 124

B - ETUDE SEMIOLOGIQUE DE DIFFERENTES ANOMALIES ENZYMATIQUES RENCONTREES DANS LE GLOBULE ROUGE.

Introduction ..... 129

Chapitre I - Etude d'un cas de déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase ..... 131

Chapitre II - Etude d'un cas de déficit passager en glucose-6-phosphate-déshydrogénase ..... 135

Chapitre III - Etude d'un cas de favisme ..... 137

Chapitre IV - Etude d'un cas d'anémie hémolytique avec hyperactivité enzymatique ..... 139

Chapitre V - Etude d'un cas d'anémie hémolytique d'étiologie inconnue ..... 141

Chapitre VI - Etude d'un cas d'anémie de Von Jaksch Luzet Hayem ... 157

Chapitre VII - Etude d'un cas de méthémoglobinémie congénitale passagère par carence en diaphorase ..... 166

CONCLUSIONS ..... 171

BIBLIOGRAPHIE ..... 173

TABLE DES MATIERES ..... 195